

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Bártová

Vliv pesticidů na včely se zaměřením na jejich endokrinně disruptivní  
účinek

Influence of pesticides on bees with focus on their endocrine  
disruptive effect

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Erban, Ph.D.

Konzultantka: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma, že experimentální část této práce byla financována z projektu QK1910018 Ministerstva zemědělství České republiky (odpovědný řešitel Dr. Tomáš Erban) a že získaná data budou využita pro realizaci výsledků tohoto projektu, jehož řešitelský tým tvoří Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy a Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.

V Praze dne 10.června 2020

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Erbanovi, Ph.D., za příležitost věnovat se této problematice. Také bych ráda poděkovala jemu i celému jeho týmu ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v. v. i. za veškerou ochotu a trpělivost při práci v jejich laboratoři. V neposlední řadě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, Ph.D. za konzultace a také děkuji pracovníkům Laboratoře hmotnostní spektrometrie v PřF UK BIOCEV.

## Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem imidaklopridu v interakci s roztočem *Varroa destructor* a jím přenášeným virem deformovaných křídel (DWV) na včelu medonosnou. Imidakloprid je systémový pesticid ze skupiny neonikotinoidů, které působí jako agonisté acetylcholinového receptoru. V EU bylo v roce 2013 používání některých neonikotinoidů včetně imidaklopridu zakázáno, protože se prokázal jejich negativní vliv na zdraví včel. Rezidua těchto látek se ale stále vyskytují v životním prostředí. Roztoč *V. destructor* byl původním parazitem včely východní (*Apis cerana*), ale v polovině minulého století se rozšířil i na včelu medonosnou (*Apis mellifera*). Tento roztoč je přenašečem řady onemocnění, jedním z nejvýznamnějších je virus deformovaných křídel, který u napadených včel způsobuje vývoj poškozených křídel. Rezidua pesticidů, varroáza, virová i bakteriální onemocnění a řada dalších faktorů mohou vést ke kolapsu včelstev. Různé faktory spolu mohou navíc přes dosud neobjasněné mechanismy interagovat a mohou tak ovlivňovat zdraví včel.

V praktické části byl proveden modelový experiment na líhnoucích se včelách (mladuškách). V polovině ze 4 variant byly včely vystaveny imidaklopridu anebo parazitaci roztočem *Varroa* získaného ze včelstev s klinickými příznaky DWV. Včely byly krmeny samotným cukerným roztokem nebo roztokem imidaklopridu o koncentraci 2,5 µg/l. Experiment probíhal 72 hodin a vzorky byly zpracovány následně analyzovány vysokokapacitním proteomickým přístupem. Výsledky ukázaly, že kombinace insekticidu v potravě a přítomnost roztoče způsobila u včel změny v proteomu. Nejdůležitějším zjištěním bylo, že DWV přenášený roztočem se stal u imidaklopridem exponovaných včel více virulentním, což se projevilo zvýšenou abundancí jeho proteinů. U včel exponovaných *Varroa* s imidaklopridem došlo k blokaci genové exprese pro hymenoptaecin, což je polypeptid s antimikrobiálními účinky. Výsledky ukazují na význam interakce mezi parazitací roztočem *Varroa* a imidaklopridem s negativním dopadem na včelstva.

## Klíčová slova

*Apis mellifera*, imidakloprid, *Varroa destructor*, virus deformovaných křídel, interakce

## Abstract

The aim of this bachelor thesis is to assess the effect of imidacloprid in interaction with the mite *Varroa destructor* and deformed wing virus (DWV), transmitted by this mite, on the honeybee. Imidacloprid is a systematic pesticide belonging to the group of neonicotinoids acting as an agonists of acetylcholine receptor. The use of neonicotinoids in EU has been banned in 2013 due to its impact on honeybee health. However, residues of these substances still occur in the environment. Since 1950s, the mite *V. destructor* has spread from the original host Asian honeybee (*Apis cerana*) to the European honeybee (*Apis mellifera*). *Varroa* is serving as the vector for viruses, like DWV causing the crippled wings. Residues of pesticides, varroosis, viral and bacterial diseases together with other factors can cause honeybee colony collapse. These factors can interact via hidden mechanisms of interactions and affect honeybee health.

The model experiment was performed using emerging worker bees. A total of four trials were performed. Two variants were treated with imidacloprid or the bees were exposed to *Varroa* collected from colonies with DWV clinical signs. Bees were fed with sugar solution or sugar solution with 2.5 µg/l of imidacloprid. Experiment lasted 72 hours and samples were analysed using a high-throughput proteomic approach. Results showed that interaction of imidacloprid and *Varroa* resulted to changes in honeybee proteome. Most importantly, DWV transmitted by *Varroa* became more virulent in imidacloprid treated bees, due to higher abundance of the viral proteins. Moreover, antimicrobial polypeptide hymenoptaecin was found to be suppressed in bees exposed to *Varroa* with imidacloprid treatment. Results indicate that interaction between parasitisation of *Varroa* and imidacloprid treatment can negatively affect honeybee colonies health.

## Key words

*Apis mellifera*, imidacloprid, *Varroa destructor*, deformed wing virus, interaction

# Obsah

<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>9</b>
2.1 VČELA MEDONOSNÁ.....	9
2.1.1 Morfologie.....	9
2.1.2 Vývojová stadia.....	9
2.1.3 Hierarchie včel.....	10
2.2 SYNDROM ZHROUCENÍ VČELSTEV (CCD).....	10
2.3 HLAVNÍ FAKTORY CCD.....	11
2.3.1 Paraziti.....	11
2.3.2 Virová onemocnění.....	11
2.3.3 Bakteriální onemocnění.....	12
2.3.4 Houbová onemocnění.....	12
2.4 PESTICIDY JAKO DALŠÍ FAKTOR CCD.....	13
2.4.1 Legislativa.....	13
2.4.2 Rozdělení pesticidů.....	14
2.5 ENDOKRINNÍ DISRUPTORY A JEJICH MECHANISMUS ÚČINKU.....	14
2.5.1 Koktejlový efekt.....	16
2.6 NEONIKOTINOIDY.....	16
2.6.1 Zákaz neonikotinoidů v EU.....	17
2.6.2 Vliv subletálních dávek neonikotinoidů na včely.....	18
2.6.3 Interakce neonikotinoidů s patogeny.....	19
2.7 PROTEOMICKÁ ANALÝZA.....	20
2.7.1 2D elektroforéza.....	20
2.7.2 Štěpení proteinů.....	21
2.7.3 LC-MS/MS.....	21
2.7.4 Kvantifikace peptidů.....	22
2.7.5 Databáze a identifikace peptidů.....	22
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>23</b>
CHEMIKÁLIE.....	23
MATERIÁL.....	23
EXPERIMENTÁLNÍ ORGANISMY.....	23
3.1 SBÍRÁNÍ ROZTOČŮ PRO BIOLOGICKÝ EXPERIMENT.....	24
3.2 EXPOZICE VČEL IMIDAKLOPRIDU A VARROA.....	25
3.3 UKONČENÍ BIOLOGICKÉHO EXPERIMENTU.....	26
3.4 HOMOGENIZACE VZORKŮ.....	26
3.5 ÚPRAVA A ANALÝZA VZORKŮ.....	26
3.6 ZPRACOVÁNÍ DAT.....	27
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>29</b>
4.1 VYBRANÉ PROTEINOVÉ HITY.....	29
4.1.1 Heat shock proteiny.....	29
4.1.2 Virové proteiny.....	29
4.1.3 Proteiny roztoče Varroa.....	29
4.1.4 Proteiny včelí imunity.....	30
4.2 KLASTROVÁ ANALÝZA PROTEINŮ.....	31
4.3 ANALÝZA HLAVNÍCH KOMPONENT (PCA).....	32
4.4 DISKUZE.....	33
<b>5 ZÁVĚR.....</b>	<b>35</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>37</b>

## Seznam zkratek

ABPV	Acute bee paralysis virus (virus akutní paralýzy včel)
BQCV	Black queen cell virus (virus černání matečnicku)
CCD	Colony collapse disorder (syndrom zhroucení včelstev)
CPV	Chronic paralysis virus (virus chronické paralýzy včel)
DDT	Dichlordifenyltrichlorethan
DWV	Deformed wing virus (virus deformovaných křídel)
ED	Endokrinní disruptor
EFSA	European Food Safety Authority (Evropský úřad pro bezpečnost potravin)
ESI	Electrospray ionization (ionizace elektrosprejem)
KBV	Kashmir bee virus (Kašmírský virus)
LFQ	Label free quantification (kvantifikace bez značení)
LRR	Leucine rich repeats (úseky bohaté na leucin)
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption (laserová desorpce s přítomností matrice)</i>
MS	Mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
nAChR	Nikotinový acetylcholinový receptor
NF-κB	Nukleární faktor kappa B
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCA	Principal component analysis (Analýza hlavních komponent)
POR	Přípravky na ochranu rostlin
SCAP	SREBP cleavage-activating protein (regulační protein pro štěpení SREBP)
SDC	Sodiumdeoxycholát
SREBP	Sterol regulatory element binding protein (transkripční faktor regulující syntézu sterolu)
SVS	Státní veterinární správa
TEAB	Triethylammonium bikarbonátový pufr
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

# 1 Úvod

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda systémový pesticid imidakloprid ze skupiny neonikotinoidů prokazatelně ovlivňuje včelu medonosnou. Používání imidaklopridu a některých dalších neonikotinoidů je v EU od roku 2013 zakázané, protože byla prokázána jejich škodlivost na zdraví včel. Včely se ale s tímto pesticidem stále setkávají při sběru pylu a nektaru, protože jeho rezidua jsou nadále přítomná v životním prostředí. Kombinace faktorů jako jsou roztoči, virová i bakteriální onemocnění včel, a právě používání pesticidů v zemědělství je podezřívána z toho, že způsobuje fenomén označovaný jako syndrom zhroucení včelstev (CCD). Protože jsou včely nenahraditelnými opylovači, CCD tak nepochybně ohrožuje fungování ekosystému.

Teoretická část pojednává o základních charakteristikách včely medonosné a dále se zaměřuje na syndrom zhroucení včelstev. Podrobně jsou zde rozebrány nejvýznamnější faktory tohoto jevu se zvláštním zřetelem na pesticidy ze skupiny neonikotinoidů a jejich možným působením jako endokrinní disruptory. Je zde uvedena řada toxikologických studií pro přehled dosud prokázaných účinků těchto látek na včely jako na necílové organismy. Teoretická část je zakončena shrnutím principů proteomických metod analýzy, které byly použity pro experimentální část.

V experimentu byly včely krmeny cukerným roztokem obsahujícím takové množství imidaklopridu, které odpovídá jeho reálnému výskytu v pylu a nektaru. V experimentu byl zároveň zahrnut roztoč *Varroa destructor*, který je běžným včelím parazitem a přenašečem řady nemocí. Roztoč byl vybrán ze včelstva postiženého virem deformovaných křídel. Doba trvání experimentu byla 72 hodin a poté byly vzorky analyzovány proteomickými metodami.



## 2 Teoretická část

### 2.1 Včela medonosná

Včela medonosná *Apis mellifera* L. je hospodářsky nejvýznamnějším zástupcem blanokřídlého hmyzu. Produkuje včelí produkty jako je med, vosk, propolis, nebo mateří kašička a především je včela ekonomicky nejdůležitějším opylovačem nejen zemědělských rostlin [1]. Kromě zemědělství a potravinářství má své uplatnění i ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu. Včelí dílo, obývané desítkami tisíc jedinců, se pro svou perfektní organizovanost označuje jako superorganismus. Obecně se považuje za předka včely vosa, která se adaptovala na sběr pylu a nektaru oproti zabíjení kořisti v období rozvoje krytosemenných rostlin, a to v době křídy, tedy asi před 100 milióny lety [2,3].

#### 2.1.1 Morfologie

Vnější kostru dospělé včely pokrývá vrstva chlupů, které ji brání před predátory nebo ztrátou vody. Tělo se člení na tři hlavní části: hlava (*caput*), hrud' (*thorax*) a zadeček (*abdomen*). Na bočních stranách hlavy má jeden pár velkých složených očí (*oculi compositi*), poskytující široký rozsah zraku. Na vrcholu temena jsou tři do trojúhelníku poskládané jednoduché oči (*ocelli*), které vnímají i v ultrafialové oblasti světla. O něco níže, asi uprostřed hlavy, se nachází pár tykadel, pokrytý póry, aneb čichové ústrojí včely velice citlivé na vůni květin, vosku ale i vlhkost vzduchu apod. Na spodní část hlavy navazují čelisti, které nabývají významu hlavně u dělnic, které díky nim přijímají potravu a manipulují s voskem a propolisem při stavbě díla. Na úplném vrcholu se nachází sosák důležitý pro příjem vody, nektaru a dalších tekutých látek, výměnu potravy mezi jednotlivými včelami, nebo i feromonů od včelí matky [2,3].

Zadeček se skládá ze 7 segmentů. Modifikací kladélka vzniklo u dělnic žihadlo, které i po bodnutí zůstává v oběti. Útočící včela po jeho vytržení umírá, ale jed se může do oběti uvolňovat až 60 sekund. Jed je směsí proteinů, peptidů a enzymů, majoritním zástupcem je protein melittin, který tvoří až 50 % hmotnostního složení. Navíc žihadlo doplňují ostny, které zajistí, že žihadlo zůstává zabodnuté v oběti. Jedové žlázy doprovází žlázy s látkami, které se po bodnutí uvolňují a zalarmují tak ostatní včely v okolí [2,3].

### 2.1.2 Vývojová stadia

Z vajíčka se po 3 dnech líhne larva, která je krmena nejdříve mateří kašičkou, poté výživově chudším medem a pylem, pokud jde o dělnici. Matka je nadále krmena mateří kašičkou. Kuklou se včelí larva stává ve chvíli, kdy ji průměrně po 7 dnech dělnice zavíčkují v plástové buňce. Nejdříve po 11 dnech se prokouše jako dospělá včela. Celková délka vývoje trubce od nakladení vajíčka po vylíhnutí je o 3 dny delší než v případě dělnice, jejíž vývoj trvá průměrně 21 dní. Naopak matka se líhne již 16. den [3]. Jednotlivé kasty a vývojová stadia se od sebe fyziologicky liší. Liší se totiž svým proteomem [4,5], což je celkový soubor proteinů exprimovaných v daný okamžik v organismu na základě jeho genomu [6].

### 2.1.3 Hierarchie včel

Včelí matka („královna“) je ve včelstvu jen jedna. Je větší než dělnice, dorůstá velikosti okolo 20 mm. Oproti dělnici, která měří okolo 14 mm, má daleko mohutnější zadeček, ve kterém se nachází vyvinuté funkční vaječníky. Zato včelí matka postrádá voskotvorné a hltanové žlázy či pylové košíčky na nohou. Z toho vyplývá, že hlavní úkol matky je klást vajíčka a udržovat tak včelstvo při životě. Z jejích oplozených vajíček se líhnou dělnice, popřípadě nová matka, a z neoplozených vajíček se líhnou trubci. Matka produkuje řadu feromonů, kterými komunikuje s ostatními včelami. Trubců je jen omezený počet a mají za úkol oplodnit matku, poté uhynou [7].

Dělnice mají hned několik rolí. Některé se starají o plod, včelí matku, jiné budují včelí dílo, brání ho, udržují v něm stálou teplotu okolo 35 °C a vlhkost, nebo shánějí potravu, kterou pak zpracovávají na další produkty. Sběr pylu, nektaru a vody obstarávají pouze dělnice. Na jaře začínají včely z díla vylétávat okolo března a to až do října podle počasí a dostupnosti květů [7].

## 2.2 Syndrom zhroucení včelstev (CCD)

V zimě na přelomu let 2006 a 2007 včelaři v Severní Americe zaznamenali velké ztráty včel [8]. Tento trend pokračoval i v dalších sezónách napříč Spojenými státy (USA) i Evropou a nedařilo se pro něj najít vysvětlení [9]. Problematice se začali ihned věnovat četné skupiny vědeckých týmů a snažili se objasnit původ tohoto jevu. Tento fenomén, česky označovaný jako syndrom zhroucení včelstev, postavil včely do popředí zájmu vědců i široké veřejnosti, přesto se však dosud nepodařilo nalézt jeho přesné vysvětlení [10]. CCD (zkratka

z anglického Colony collapse disorder) se projevuje jako úbytek včelích dělnic. V díle tak zůstává matka, včelí plod a jen nedostatečný počet dělnic. Včelstvo není schopné se o sebe postarat. V díle ani jeho blízkém okolí se však nenachází mrtvá těla chybějících včel. Předpokládá se, že příčinou tohoto jevu bude nejspíše kombinace hned několika faktorů. Uvažuje se především vliv parazitů (mj. *V. destructor*) a pesticidů, ale i virů, bakterií nebo houbových patogenů a jejich interakcí [11].

## 2.3 Hlavní faktory CCD

### 2.3.1 Paraziti

Původcem varroázy je ektoparazitický roztoč *Varroa destructor* (česky kleštík včelí). Jeho původním hostitelem byla včela východní (*Apis cerana*), ale přibližně před 70 lety se tento roztoč dostal až na území, kde se vyskytovala včela medonosná a došlo tak k jeho přenosu z původního hostitele. Do roku 2000 byl jako původce označován *Varroa jacobsoni*, ale ten je parazitem výhradně zmíněného asijského druhu, kdežto v Evropě, USA a dalších zasažených oblastech je rozšířený jeho příbuzný druh *V. destructor*, jak ukázala analýza na molekulární úrovni [12]. Protože jde o původního parazita včely východní, její napadení nemá tak ničivé důsledky jako právě pro včelu medonosnou. Jednak díky kratší době vývoje plodu včely východní, navíc její dělnice umí rozpoznat napadený plod, který pak odstraňují, aby zamezily dalšímu šíření nákazy [13].

Oplozená samička roztoče se nechá zavíčkovat v plodové buňce. Preferuje buňku trubce kvůli jeho delšímu vývoji. Krmí se nejdříve hemolymfou včelí larvy a naklade v buňce svá vajíčka. Z těch se nejdříve líhnou pohlavně zralí samečci a po nich samičky. Když samičky pohlavně dozrají, dojde k oplození mladých samiček, po kterém samečci uhynou, a následně se oplozené samičky uchytí na mladé včele, se kterou po jejím vylíhnutí opustí buňku. Poté samička několik dní parazituje na dělnicích, kterým saje hemolymfu, a pak se opět nechá zavíčkovat ve včelím plodu [14]. Silně napadená včelstva nejsou schopná přezimovat, což má za následek jejich vymírání [15].

Každý rok jsou čeští včelaři povinni odevzdat Státní veterinární správě (SVS) zimní měl (odpad ze dna úlu) ke sledování výskytu tohoto parazita. Takovéto vzorky musí odevzdat do 15. února pro vyhodnocení intenzity varroázy v jednotlivých stanovištích. V letošním roce vydala SVS ve spolupráci s externími odborníky metodický pokyn, sloužící chovatelům včel k postupu při tlumení výskytu roztočů ve včelstvech [16].

### 2.3.2 Virová onemocnění

Roztoč *Varroa* funguje navíc jako přenašeč virů jak mezi jednotlivými včelami v dílu, tak mezi včelstvy [17]. S jeho významným rozšířením v 80. letech 20. století se virová onemocnění včel, dosud považovaná za poměrně neškodná, stala závažným problémem. Například virus způsobující akutní paralýzu včel (zkratka ABPV z angl. acute bee paralysis virus) se stává při přímém přenosu do hemolymfy, kterou se parazit živí, více virulentním než při jiných způsobech přenosu, a takto napadená včela do 4 dnů umírá [18]. Asi nejvýznamnějším virem přenášeným *Varroa* je virus deformovaných křídel (zkratka DWV z angl. deformed wing virus) způsobující deformaci nebo nevyvinutí křídel v průběhu metamorfózy v zavíčkovaných buňkách a následné oslabení a úhyn především zimního včelstva [19].

Mezi nejvýznamnější původce virových onemocnění se řadí dále kašmírský virus (zkratka KBV z angl. Kashmir bee virus), virus chronické paralýzy včel (zkratka CBPV z angl. chronic bee paralysis virus) nebo virus černání matečnicku (zkratka BQCV z angl. black queen cell virus) [20]. Celkem bylo k roku 2015 identifikováno na 23 různých virů napadajících včelu medonosnou [21]. Existují ale i další méně běžné viry, které zatím nejsou dostatečně popsány [22].

### 2.3.3 Bakteriální onemocnění

Celosvětově rozšířeným bakteriálním onemocněním je mor včelího plodu způsobený bakterií *Paenibacillus larvae*, jejíž endospory jsou infekční pro larvální stadium včel. Projevuje se prázdnými buňkami v plodu, naopak zavíčkované buňky mohou typicky zapáchat hnilobou a mít slizovitý povrch. Z těchto nakažených buněk šíří dál infekci dělnice přes kontaminovaný vosk, med nebo další včelí produkty [23]. Úhyn larev může zapříčinit i podobně vypadající nesporulující bakterie *Melissococcus plutonius*, jež způsobuje tzv. hnilobu včelího plodu [24,25].

### 2.3.4 Houbová onemocnění

Nejběžnějšími houbovými patogeny včel jsou dva příbuzné druhy mikrosporidií *Nosema apis* a *Nosema ceranae*. Původním hostitelem *N. ceranae* je včela východní, ale dnes je už běžným parazitem i včely medonosné [26]. Jedná se o střevní parazity včel, způsobující snížení proteolytické aktivity střev [27]. Kromě toho také infekce ovlivňuje chování, a to například

zvýšenou dezorientací, která se může projevit delší dobou návratu do díla nebo i neschopností infikované včely své dílo najít [28].

## 2.4 Pesticidy jako další faktor CCD

Pesticidy jsou látky určené k hubení či odpuzení škůdců rostlin, zvířat i člověka. Mohou být přírodního původu, dnes se ale většina připravuje synteticky. Pod tento pojem se řadí biocidy a přípravky na ochranu rostlin (POR) [29]. V EU jsou registrovány stovky aktivních látek pesticidů [30], které jsou součástí tzv. formulací, jejichž další složky zlepšují vlastnosti přípravku [31]. Pesticidy se hojně začaly využívat ve 30. letech 20. století, ale brzy se ukázaly jejich negativní dopady na životní prostředí i zdraví člověka. Asi nejznámějším případem je DDT. V ideálním případě správného užívání by měl být pesticid efektivní, selektivní a bezpečný [29].

V organismu škůdce může pesticid interagovat se specifickým enzymem, receptorem či jiným proteinem nebo membránou daného organismu, čímž jej poškozuje a způsobí jeho oslabení až smrt. Brání například synaptickému přenosu, blokuje určité metabolické dráhy nebo brání buněčným pochodům. Tyto vyvolané změny můžou být naprosto odlišného charakteru v necílových organismech oproti škůdcům [29].

Právě opylovači jsou relevantním a častým necílovým organismem použití POR na zemědělských plodinách. Reflektují tak stav životního prostředí v dané lokalitě a stávají se ideálním modelem pro ekotoxikologii. Takovým bioindikátorem mohou být právě včely i včelí produkty, které vypovídají o stavu prostředí v rozsahu jejich doletu od díla [32]. Včela létá od svého díla do vzdálenosti 5 až 6 km [33]. V reálných podmínkách se navíc nesetkává jen s jedním pesticidem. Jde o směs použitých látek a tím, že opyluje více druhů rostlin, se setkává s nejrůznějšími přípravky. Kromě toho včelaři často používají v úlech akaricidy, tedy přípravky určené na tlumení varroázy způsobené zmíněným roztočem *Varroa* [34].

### 2.4.1 Legislativa

Používání pesticidů v Česku reguluje aktuálně zákon č. 369/2019 Sb., zákon, kterým se mění zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a další související zákony. Ten zapracovává nařízení a směrnice Evropského parlamentu a rady EU [35].

Dále je v platnosti *Národní akční plán k bezpečnému používání pesticidů v České republice pro 2018–2022*. Plán schválila vláda ČR a následně byl sdělen Evropské komisi

a dalším členským státům EU. Soubor opatření se snaží o snížení rizik a omezení dopadů používání přípravků na lidské zdraví a životní prostředí, s cílem podpořit vývoj a zavádění integrované ochrany a alternativních přístupů nebo postupů, aby se snížila závislost na používání přípravků [36].

## **2.4.2 Rozdělení pesticidů**

Podle cílového organismu dělíme pesticidy dle jejich účinku na

- fungicidy k hubení hub,
- herbicidy k hubení rostlin,
- insekticidy k hubení hmyzu,
- rodenticidy k hubení hlodavců a další [29].

Podle chemické povahy rozlišujeme

- karbamáty,
- neonicotinoidy,
- organofosfáty,
- organochlorované sloučeniny,
- pyrethroidy a další [29].

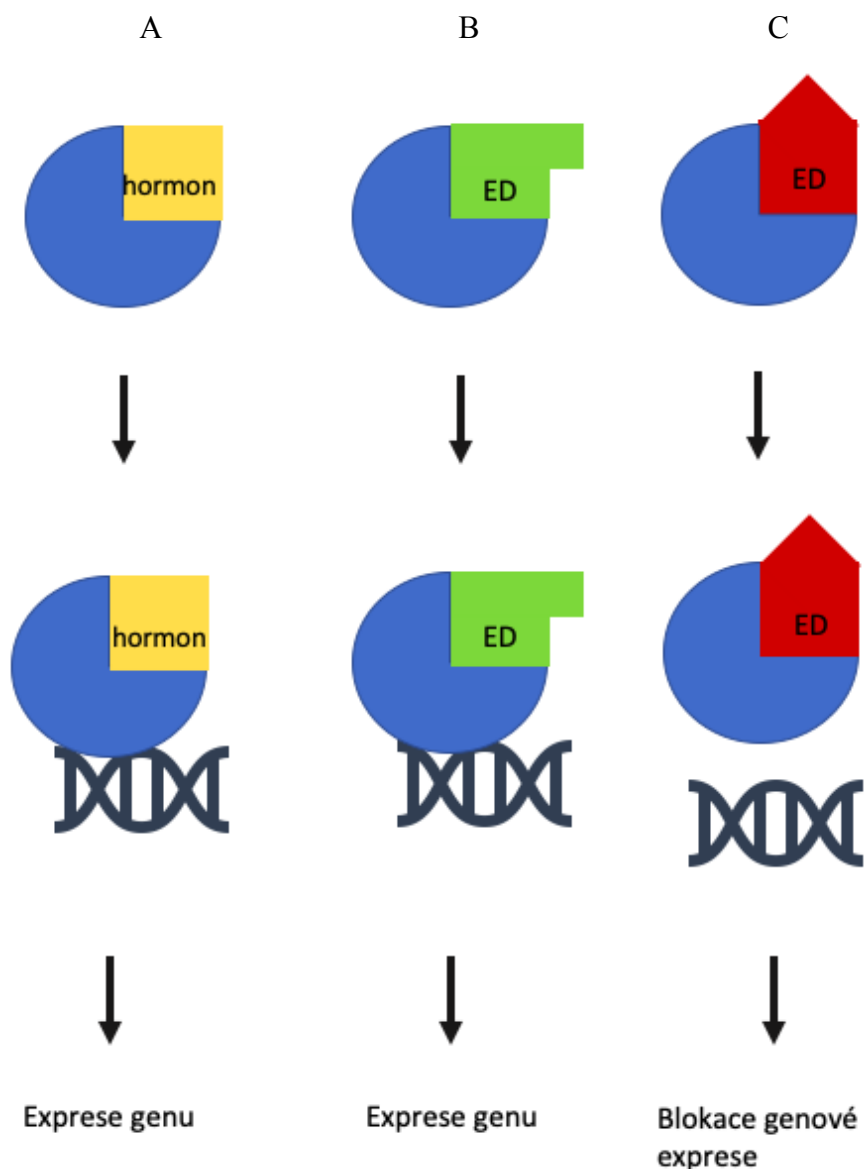
## **2.5 Endokrinní disruptory a jejich mechanismus účinku**

Právě některé pesticidy jsou prokázány endokrinními disruptory (ED) a některé další jsou podezřelé ED. Světová zdravotnická organizace definuje ED jako exogenní látku nebo směs látek, která ovlivňuje funkci endokrinního systému, čímž vyvolává nepříznivé účinky v organismu, jeho potomstvu, nebo jeho populaci. ED jsou podezřelé ze změn reprodukčních funkcí, zvýšeného výskytu rakoviny, narušeného vývoje dětí nebo změn imunitního systému. Obzvláště nebezpečné se jeví pro těhotné ženy a děti [37].

Jedná se o látky, které zasahují do endokrinního systému organismu tím, že se vážou na jaderné receptory, kde působí jako agonisté či antagonisté a aktivují tak nebo blokují genovou transkripci (obr. 1, str. 15). Mohou také ovlivňovat syntézu, transport, eliminaci či jakýkoli jiný průběh běžných dějů daného hormonu. Svým působením narušují homeostázi a zasahují tak do vývoje, reprodukce nebo imunitního systému organismu [38,39].

Kromě pesticidů mohou jako ED fungovat složky plastů, průmyslová rozpouštědla, ale i látky z čistících prostředků do domácnosti, složky kosmetiky, léky nebo třeba fytoestrogeny

a mykoestrogeny [38,39]. Některé možné účinky na lidský organismus známých endokrinních disruptorů jsou uvedeny v tabulce 1 na straně 15.



**Obr. 1** Schéma mechanismu účinku ED: **A)** normální průběh navázání hormonu na jaderný receptor, **B)** ED funguje jako agonista, **C)** ED funguje jako antagonistista [38].

**Tabulka 1** Vybrané příklady endokrinních disruptorů a jejich možné účinky na lidský organismus

Látka	Použití	Možné účinky
DDT	insekticid	snižování plodnosti, narušení funkce androgenů, snižování pohyblivost spermií [40]
glyfosát	herbicid	pravděpodobný karcinogen [41]
bisfenol A	součást plastů	rakovina prsu, prostaty [42]
triclosan	antimikrobiální složka	narušení vývoje plodu [43], alergie a astma [44]

### 2.5.1 Koktejlový efekt

Některé látky, vyskytující se v životním prostředí, nemusí přes svou přítomnost vyvolávat pro nízkou koncentraci žádné viditelné či měřitelné účinky. Jejich kombinací ale nastává jev označovaný jako koktejlový efekt, kdy společně v interakci mohou látky působit aditivně, synergicky, ale i antagonisticky. Příkladem synergického účinku je estrogen 17 $\alpha$ -ethynylestradiol z hormonální antikoncepce a pesticid *trans*-nonachlor, které společně působí na lidský jaderný receptor pregnane X [45]. Funkcí tohoto receptoru je zajistit expresi genů zodpovědných za detoxifikaci [46]. Jednotlivě jsou obě molekuly moc malé, ale společně tvoří díky van der Waalsovým interakcím stabilní binární komplex s vyšší afinitou k zmíněnému receptoru. Tento „supramolekulární“ ligand se pak váže k ligand vázajícímu proteinu receptoru a vyvolává biologickou odpověď [45].

K obdobnému jevu může docházet i u včel. V jejich pylu totiž lze detekovat směs nejrozličnějších reziduí pesticidů a dalších látek, které spolu mohou nejrozličněji interagovat [34]. Navíc jak bylo popsáno výše, komerční složení pesticidu, tzv. formulace, se skládá nejen z aktivní látky ale i dalších pomocných složek zlepšujících její vlastnosti [31]. Takovýto mix může mít ve výsledku nepředvídatelný vliv. Aktivní látka běžně představuje méně než 50 % složení pesticidu. Pomocné látky například způsobují, že aktivní látka může prostupovat hydrofobní rostlinou kutikulou či biologickou membránou škůdce, nebo zlepšují její rozpustnost ve vodě. Akutní i chronické toxikologické testy se ale většinou provádí jen pro aktivní látku pesticidu a neposkytují tak dostatečně komplexní informace o možných dopadech na necílové organismy. Studie zabývající se touto problematikou ale ukazují, že mnohé formulace jsou toxičtější než samotná aktivní látka [47].

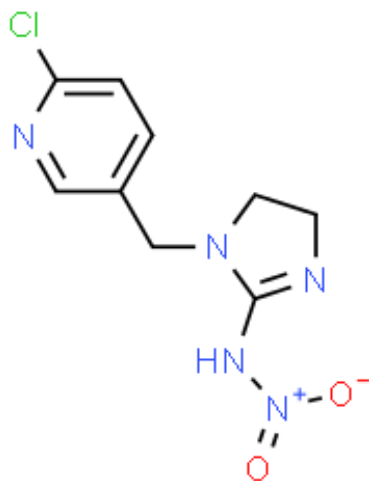
## 2.6 Neonikotinoidy

V 90. letech 20. století se začaly hojně používat tzv. neonikotinoidy. V roce 2010 tvořily až 25 % celkového trhu s pesticidy. Jde o systémové insekticidy působící na nervovou soustavu hmyzu. Účinná látka proniká do celé rostliny a je tak i součástí pylu a nektaru, se kterými se dostává do včelstev [48]. Strukturně se neonikotinoidy podobají přírodnímu alkaloidu nikotinu a jde tak o agonisty nikotinového acetylcholinového receptoru. Ten po prvotní excitaci blokuje, což paralyzuje zasažený organismus [49]. Tyto insekticidy se vyznačují vyšší toxicitou pro hmyz než pro obratlovce díky vyšší afinitě k hmyzímu nAChR v porovnání



s obratlovci [50,51]. Právě neonikotionidy v čele s imidaklopridem (obr. 2, str. 17) jsou spojovány s fatálními důsledky pro včely a další opylovače [52].

Do této skupiny dále patří thiametoxam, klothianidin, thiaklopid, dinotefuran, acetamiprid a další [49].



**Obr. 2** Strukturní vzorec imidaklopridu [53]

### 2.6.1 Zákaz neonikotinoidů v EU

V roce 2013 bylo v EU schváleno pět neonikotinoidů pro používání na ochranu rostlin. Šlo o klothianidin, imidaklopid, thiamethoxam, acetamiprid a thiaklopid. Ještě v témže roce se ale Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) začal zabývat riziky spojenými s používáním klothianidinu, imidaklopridu a thiamethoxamu pro včely a další opylovače [54]. Jejich užívání bylo zakázáno pro rostliny opylované včelami (jako např. kukuřice, řepka olejka a slunečnice). Výjimku měly skleníky, rostliny po odkvětu a ozimé obiloviny [55]. V roce 2017 byl připraven návrh na jejich úplné zakázání ve venkovním prostředí, který byl schválen o rok později. Tento zákaz vycházel z řady vědeckých studií a testů a nahradil tak prozatímní řešení z roku 2013 [56–58]. Rizikovost acetamipridu pro včely EFSA vyhodnotila jako nízkou a zákaz se na něj tedy nevztahuje [59]. Povolení používání thiaklopridu expirovalo 30. 4. 2020. Každý členský stát byl vyzván k hledání alternativy, protože i tato látka se chová jako ednokrinní disruptor [54]. Výzkumy ukazují, že thiaklopid způsobuje vyšší úmrtnost včel, navíc doprovázenou snižováním jejich hmotnosti a narušuje také jejich střevní mikrobiom [60]. Kromě toho ovlivňuje u včel metabolismus mastných kyselin, aminokyselin nebo fosfolipidů [61].

## 2.6.2 Vliv subletálních dávek neonikotinoidů na včely

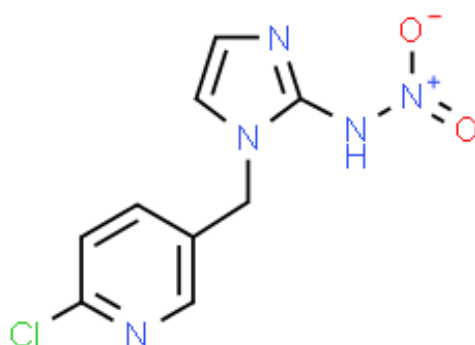
LD<sub>50</sub> imidaklopridu se udává v řádech desítek ng na včelu v případě orálního či kontaktního způsobu aplikace po dobu 48 hodin [62,63]. Výskyt imidaklopridu v pylu se pohybuje v jednotkách  $\mu\text{g/kg}$  [64,65]. Studie pracující s údajem 3,4  $\mu\text{g/kg}$  odhaduje, že v závislosti na vývojovém stádiu a kaste (liší se spotřeba potravy, doba odpovídající danému stádiu) včela v jednotlivé fázi vývoje spotřebuje desetiny až jednotku ng imidaklopridu během několika dní [66].

Nepředvídatelné problémy tak způsobují subletální množství pesticidů a zejména jejich mixů přítomných v životním prostředí. Jejich dopad na organismus se nedá predikovat z akutních testů toxicity, nýbrž je zapotřebí vysledovat jejich možný dlouhodobý mechanismus účinku v dávkách odpovídajících reálným podmínkám, se kterými se nejen opylovači setkávají [47].

Velmi nepředvídatelné chování bylo indikováno právě pro imidaklopid, který je nejúčinnějším neonikotinoidem. Experimentální podávání subletálních dávek imidaklopridu včelám prokazatelně způsobilo snížení genové exprese genů zodpovědných za detoxifikaci a imunitu, například genů pro cytochrom P450. Kromě toho způsobilo snížení exprese genů spojených s oxidoreduktázovou aktivitou. Behaviorální testy prokázaly snížení schopnosti chemosensorického učení, které je pro včelu klíčové při opylení a následném návratu do díla [67].

Další studie prokázala, že imidaklopid, thiaklorpid a klothianidin v subletálních dávkách způsobily zhoršení imunitní odpovědi a to poklesem počtu hemocytů, a tedy sníženou schopností enkapsulace, a snížením antimikrobiální aktivity hemolymfy [52].

Kromě toho se v organismu kumuluje metabolit imidaklopid-olefin (obr. 3, str. 19), který je pro opylovače toxičtější, než jeho původní forma [62]. V experimentu se čmeláky po uplynutí 5 týdnů dokonce tento metabolit v organismu více než 3× převyšoval nad samotným imidaklopidem [68]. To by mohlo vysvětlovat dříve popsany kumulativní efekt imidaklopridu [69]. Proteomická analýza čmeláčích hlav z kolonií exponovaných imidaklopidem také odhalila vedlejší mechanismus účinku této látky a to ten, že potlačuje syntézu mastných kyselin a také mevalonátovou dráhu. *In silico* analýza ukázala, že oba metabolity se totiž váží na SCAP protein [68], jehož funkcí je regulovat SREBP transkripční faktor [70], což je regulační protein pro expresi enzymů potřebných pro syntézu cholesterolu [71].



**Obr. 3** Strukturní vzorec imidakloprid-olefinu [72]

### 2.6.3 Interakce neonikotinoidů s patogeny

Jak již bylo zmíněno, včela kromě pesticidů musí odolávat řadě nejrůznějších patogenů jako jsou viry, bakterie, roztoči, houby a další. Je proto důležité neopomenout ani možnost interakce pesticidu s nějakým z patogenů a tedy jeho nepřímého vlivu na včely [73–76]. Kromě toho pesticidy mohou narušovat vnitřní mikrobiom včely, který je nenahraditelný nejen pro její imunitu ale celkové prospívání [60,77].

Experimentálně podávané subletální dávky imidaklopridu včelám korelují s větším rozšířením patogenu *Nosema* při stejném způsobu nákazy než u kontrolních včel [73]. Výzkum publikovaný v roce 2010 se pak zabýval interakcí mezi imidaklopridem a parazitickým druhem houby *Nosema cerenae*. Výsledky ukázaly, že kombinace tohoto pesticidu a patogenního mikroorganismu zapříčinila vyšší úmrtnost včel než v kontrolních skupinách. Zároveň kombinace obou faktorů způsobila včelám vyšší energetický stres než včelám neexponovaným [74]. Energetický stres je vyvolán tím, že parazitická mikrosporidia jsou závislá na ATP svého hostitele, protože nepřítomnost mitochondrií jim neumožňuje oxidativní fosforylaci [78]. U jednotlivých včel se pak zaznamenávala změna jejich imunity a to jako fenoloxidázová aktivita enzymů, která je součástí fenoloxidázové kaskády vedoucí k melanizaci patogenů u bezobratlých [79], a množství hemocytů, které mají schopnost fagocytovat cizorodé částice [80]. V této studii však nebyl prokázán vliv na tyto dva faktory včelí imunity [74]. Jiná studie, zabývající se synergickým vlivem neonikotinoidu thiametoxamu a parazitického *N. apis*, ovšem prokázala nejnížší míru enkapsulace cizorodých částic u včel vystavených oběma faktorům [75]. Zřejmě záleží na zvolené metodě vyhodnocení imunitní odpovědi. Ze zvýšené úmrtnosti i konkrétních ukazatelů oslabené

imunity se dá předpokládat, že pesticid narušuje včelí imunitu a ta pak snáze podléhá patogenu.

Stejný trend ukázaly i experimenty se včelami krmenými cukerným roztokem s neonikotinoidem thiametoxamem, který se ve včelách metabolizuje na klothianidin, v kombinaci s nákazou virem chronické paralýzy včel. Nejvyšší úmrtnost vykazovaly skupiny včel, vystavené virové nákaze a zároveň nejvyšší dávce pesticidu [76]. V jiném experimentu se zimními včelami ukázaly výsledky qPCR nejvyšší výkyt CPV v těch včelách, které byly exponované thiametoxamem a vystaveny nákaze tímto virem, oproti včelám neexponovaným [81].

## 2.7 Proteomická analýza

Proteomika je souhrn analytických metod umožňujících identifikovat proteiny, zhodnotit jejich expresi či funkci [82]. Pojmem proteom označil poprvé v roce 1995 Marc Wilkins celkový soubor proteinů v organismu [6]. Starší metody 2D elektroforézy, hodící se hlavně k vizualizaci konkrétních proteinů, dnes předčily analytické metody proteomiky umožňující kvalitativní, kvantitativní i funkční určení proteinů [82].

Díky proteomice můžeme u včel odlišit jednotlivé kasty i vývojové stupně a porozumět mechanismu účinku různých stresových faktorů. Lze sledovat proteom až už celého organismu nebo třeba jen jednoho orgánu. Oproti genomu poskytuje proteom komplexnější informaci, zahrnuje totiž vliv prostředí a různých posttranslačních modifikací [82,83]. Kromě toho se dají metody použít i na proteiny v materiálech jako je včelí med [84].

Pro rozvoj proteomiky byl zásadní vývoj separačních chromatografických metod, rozvoj hmotnostní spektrometrie a obzvláště nedestruktivních ionizačních metod. Zároveň možnosti bioinformatiky umožnily zpracování velkého množství dat. Zkoumání včelího proteomu tak pomohlo na molekulární úrovni porozumět ontogenezi včel a tím fungování tohoto superorganismu [83]. U včel byl důležitým mezníkem i rok 2006, kdy byl oskenován jejich genom [85].

### 2.7.1 2D elektroforéza

Dvourozměrná elektroforéza využívá dvou vlastností proteinů, a to rozdílných izoelektrických bodů a velikostí molekul. V prvním kroku se proteiny rozdělí podle svého  $pI$  v  $pH$  gradientu [86]. Nejdříve by však měly být vzorky vždy zbaveny interferujících látek a disulfidických můstků. Ty lze zredukovat např. pomocí dithiothreitolu a zpětné oxidaci

zamezit alkylací iodoacetamidem. Po prvním kroku, neboli elektrofokusaci, jsou imobilizované proteiny na gelových stripech vloženy do aparatury na elektroforézu [87]. Poté následuje SDS elektroforéza, kde se proteiny vertikálně dělí podle své velikosti např. v TRIS-pufu. Z výsledné mapy proteinů tak lze z gelu oddělit konkrétní bílkoviny nebo porovnat různé vzorky [86].

### 2.7.2 Štěpení proteinů

Tzv. bottom-up a shotgun proteomická technika zahrnuje štěpení vzorku před samotnou analýzou. U bottom-up techniky předchází štěpení ještě jedno či dvoudimenzionální elektroforéza nebo chromatografická separace proteinů. Shotgun metoda se naopak snaží zachovat a analyzovat všechny komponenty vzorku. Štěpení zvyšuje kvalitu následně získaného spektra z hmotnostního analyzátoru [88,89].

Může se jednat o štěpení enzymatické i neenzymatické pomocí chemikálií. Enzymatické provedení pomocí proteáz je závislé na zvolené teplotě, pH roztoku, koncentraci enzymu i dalších faktorech podle zvoleného enzymu [87]. Běžně používaným enzymem je prasečí trypsin, který má teplotní optimum okolo 37°C a štěpí peptidy od N konce za argininem a lysinem, pokud je nenásleduje prolin [90,91]. Přečištěný vzorek lze štěpit jak v roztoku, tak v gelu. Štěpení by mělo probíhat několik hodin, nejlépe přes noc, a zastaví se kyselinou. Poté mohou vzorky, pokud jsou v roztoku, ihned vstupovat do LC-MS/MS analýzy [87].

### 2.7.3 LC-MS/MS

Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie umožňuje identifikaci biomolekul jako právě peptidů. Běžně se využívá nanoLC technologie s nízkým průtokem kvůli vyšší citlivosti, díky které ve spojení s jemnými metodami ionizace detekujeme až řády fentomolů [92].

Dalším důležitým krokem je nedestruktivní ionizační metoda ESI (ionizace elektrosprejem) za atmosférického tlaku, popřípadě MALDI (matrix-assisted laser desorption). Peptidy jsou při metodě ESI po výstupu z úzké kapiláry, na kterou je vkládáno napětí, zbavovány rozpouštědla, čímž zmenšují svůj povrch a zvětšují povrchové napětí. Navíc se snižuje pH, čímž získáváme protonované analyty, dokonce vícenásobně nabitě [93].

V prvním kroku hmotnostní analyzátor rozdělí veškeré ionty podle  $m/z$ . V druhém kroku se naakumulují pouze ionty o konkrétním  $m/z$ , vstupují do kolizní cely a jsou štěpeny

na fragmenty, které vstupují do druhého hmotnostního analyzátoru. Získané píky fragmentů odpovídají ztrátě aminokyselin z původního peptidu. Sekvencí těchto fragmentů tak lze sestavit původní aminokyselinovou sekvenci peptidu [92,94].

#### **2.7.4 Kvantifikace peptidů**

Label free kvantifikace (LFQ) je bezpochyby levnější než izotopové značení, které této technice konkuruje. Kvantifikovat tímto způsobem peptidy je možné dvěma přístupy. Jednodušší je prosté zaznamenávání frekvence spektra daného peptidu. Druhá možnost, hodící se pro tandemové uspořádání, kvantifikuje peptid na základě intenzity jeho signálu z MS spektra. Tandemové uspořádání totiž poskytuje přesnější spektra [95].

#### **2.7.5 Databáze a identifikace peptidů**

Získaná hmotnostní spektra je v poslední fázi nutné přiřadit odpovídajícím peptidům. K tomu slouží programy, které srovnávají získaná hmotnostní spektra aminokyselinových sekvencí s teoretickými spektry z proteinových databází, spravovanými např. National Center for Biotechnology Information (NCBI) či UniProt. Při vyhodnocení výsledků je nutné doplnit modifikace odpovídající použitému štěpícímu enzymu a dalším reagentům [96].

## 3 Experimentální část

### Chemikálie

Filtrovaná (0,2 µm) nanopure voda (získána pomocí 2 zařízení Thermo Scientific Barnstead RO a Thermo Scientific Barnstead NANOpure Water Purification System, Life Science, USA)

Imidaklopid (katalogové číslo: 37894, analytický standard, Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Trimethylammonium bikarbonátový pufr (katalogové číslo: 18597, 1 M, for HPLC, LiChropur™, Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Sodiumdeoxycholát (katalogové číslo: 30970, čistota ≥ 98,0 %, Sigma-Aldrich, Itálie)

Panenský vosk (získáno z oddělků včel VÚRV v. v. i.)

Cukr krystal (Tereos TTD, Česká republika)

### Materiál

Termostat s nucenou cirkulací (ST 1200, POL-EKO-APARATURA SP.J., Polsko)

Skleněný homogenizátor Potter-Elvehjem s teflonovým pístem 5 ml – (Katell, Itálie)

Homogenizátor (PSB 650 RE, Bosch)

Centrifuga (Heraeus Megafuge 8R centrifuge, Thermo scientific, Německo)

Analytické váhy (E0RV70, Ohaus, Švýcarsko)

Sterilní 1ml stříkačky (B.Braun, Německo)

Plastové krabičky pro výrobu klícek (Euroboxx, Německo)

Sterilní flakony (Sarstedt, Německo)

Včelařské vybavení (včelařský klobouk, rozpěrák, nástavek, rámeček, plechové víko, podložka pro odběr měli, dýmák)

Software MaxQuant (verze 1.6.3.4)

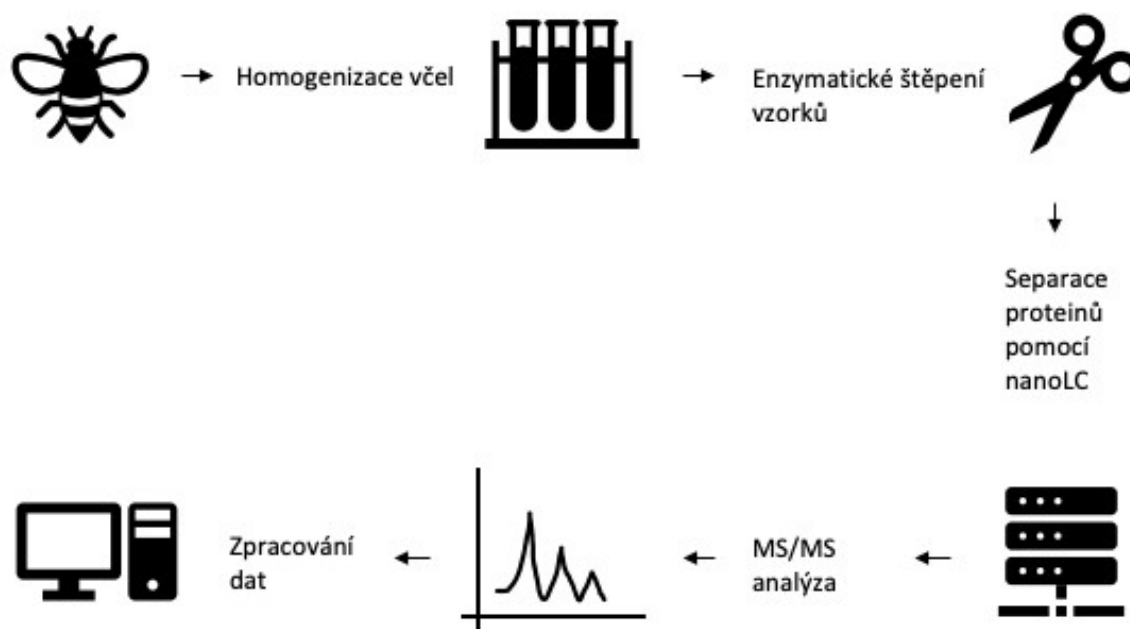
Software Perseus (verze 1.6.2.3)

### Experimentální organismy

Včely a roztoči z úlů Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73

161 06 Praha 6 – Ruzyně

Obrázek 4 shrnuje průběh experimentu a zpracování vzorků. Nejdříve byl připraven biologický materiál, který byl následně homogenizován a poté proteomicky analyzován. Získaná data byla vyhodnocena pomocí LFQ kvantifikace a databáze NCBI. Vyhodnocení a vizualizace byla provedena v programu Perseus.



**Obr. 4** Schéma experimentu. Obrázek vlastní.

### 3.1 Sbírání roztočů pro biologický experiment

Nejdříve bylo nutné nasbírat roztoče *V. destructor*. Z včelstva postiženého virem DWV byl vyjmut plást, na kterém se v daném momentu líhly včelí dělnice (mladušky). Z plástu se skleply dospělé včely a byl přenesen do laboratoře. Roztoči pak byli vybíráni pomocí štětečku a *pinzety* jen z čerstvě vylíhlých včel a jejich buněk. Roztoči byli dále uchováváni na tzv. udržovacích včelách. To byly líhnoucí se včely, které byly vybrány ze stejného plástu a umístěny v klínce, do které se postupně přidávali všichni nasbíraní roztoči. Tyto udržovací včely s roztoči byly po 24 hodin umístěny v termostatu při teplotě 35 °C, která odpovídá podmínkám v úlu a krmeny cukerným roztokem. Cukerný roztok byl připraven v poměru 1:1, tedy 1 kg cukru byl rozpuštěn v 1 l pitné vody. Klícky byly zhotovené z průhledných plastových krabiček, které byly na dně prodyšné a na vrchu měly díru, do které se zasunula 1ml inzulinová stříkačka naplněná cukerným roztokem. Jejich stěny byly zevnitř potřené včelím voskem, aby včelám připomínaly prostředí úlu.



## 3.2 Expozice včel imidaklopridu a *Varroa*

Po 24 hodinách od sbírání roztočů se z plástu zdravého včelstva vybralo celkem 32 líhnoucích se včel a rozdělily se do 4 klíček po 8 jedincích. Jedna skupina byla skupina kontrolních včel KON, která byla krmena cukerným roztokem z 1ml stříkačky zasunuté v klícce. Druhá skupina KON\_IMI byla krmena cukerným roztokem s imidaklorpidem o koncentraci 2,5 µg/l (přípraven z analytického standardu). Třetí skupina VAR byla krmena cukerným roztokem a na včely se umístili roztoči. Pro simulaci běžných podmínek silně napadeného včelstva byly na jednu včelu umístěni 3 roztoči. Roztoči byli přeneseni pomocí štětečku z udržovacích včel skrz otvor na stříkačku do klíčky pokusných včel. Celkem tak do klíčky bylo přemístěno 24 roztočů. Protože se do půl hodiny 6 z těchto roztočů na včelách neuchytilo, bylo do klíčky doplněno dalších 6 kusů roztočů. Poslední skupina včel VAR\_IMI byla krmena cukerným roztokem s imidaklopridem o koncentraci 2,5 µg/l. Na tyto včely se stejným postupem přemístilo 24 roztočů, ale po půl hodině bylo doplněno dalších 5 kusů roztoče, protože se na včelách neuchytili.

Všechny 4 skupiny včel byly v následujících 72 hodinách uchovávány v klíčkách v termostatu při 35 °C. Experimentální podmínky všech skupin jsou shrnuté níže v tabulce 2 a tabulce 3. Vždy po 24 hodinách, kdy spotřebovala každá skupina včel okolo 0,05 ml cukerného roztoku, bylo všem skupinám vyměněno 0,5 ml čerstvého roztoku.

**Tabulka 2** Experimentální podmínky

Počet včel ve skupině	Doba experimentu	Koncentrace imidaklopridu v potravě	Počet <i>Varroa</i> na 1 včelu
8 ks	72 hodin	2,5 µg/l	3 ks

**Tabulka 3** Experimentální podmínky jednotlivých skupin včel

Název skupiny	Imidaklopid v potravě	Přítomnost <i>Varroa</i>
KON	NE	NE
KON_IMI	ANO	NE
VAR	NE	ANO
VAR_IMI	ANO	ANO

### 3.3 Ukončení biologického experimentu

Před ukončením experimentu (14. 9. 2019) zemřely 2 včely ze skupiny KON (nalezeny 11. 9. 2019). Ze skupiny VAR\_IMI zemřela 1 včela (nalezena 12. 9. 2019) a ze skupiny VAR 2 včely (nalezeny 13. 9. 2019). Po 72 hodinách do začátku experimentu, byli z klíček vybráni volní roztoči, kteří nebyli přichyceni na včelách. Ti byli dále zamrazeni a uloženi při -80 °C pro případnou další analýzu. Následně byly včely uspány a usmrceny krátkým zamražením a po jednom kusu umístěny do 1,5ml zkumavek. Vzorky byly uchovány při -80 °C. Protože ve skupinách KON a VAR uhynuly 2 včely, bylo z každé skupiny pro další analýzu zpracováváno pouze 6 včel. Uhynulé včely nebyly do analýzy zahrnuty.

### 3.4 Homogenizace vzorků

Ze vzorků včel VAR a VAR\_IMI byli před homogenizací pomocí pinzety ze včel odebráni roztoči. Jednotlivé včely byly vloženy do 2,5 ml připraveného 100mM TEAB pufru s 2% obsahem SDC v 5ml zkumavce na ledu. Následně byly vzorky 3x krátce homogenizovány (přibližně 2 minuty) s 10minutovou pauzou mezi jednotlivými homogenizacemi, během které byly vzorky uchovávány na ledu. Poté se každý vzorek jednotlivě přelil do 15ml plastového flakonu a byl odstředěn na stolní centrifuze silou 3000G po 10 minut při 4 °C.

### 3.5 Úprava a analýza vzorků

Úpravu a analýzu homogenátů provedla laboratoř proteomiky BIOCEV (Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci) a zde je shrnut jen základní postup.

Zredukované disulfidické můstky proteinů byly alkylovány chloracetamidem. Poté byly proteiny izolovány pomocí magnetických kuliček se speciálním povrchem pokrytým karboxylovými kyselinami, které slouží k zachycení proteinů. Vzorky byly štěpeny přes noc pomocí prasečího trypsinu při teplotě 37 °C.

Peptidy byly poté separovány metodou nanoLC následované Orbitrap FusionT<sup>TM</sup> Tribrid<sup>TM</sup> hmotnostně spektrometrickou analýzou. Pro kapalinovou chromatografii byla použita kolona o nízkém průtoku s C18 reverzní fází. Peptidy byly dále ionizovány pomocí elektrospreje a prekurzorové ionty skenovány v rozmezí 350 až 1400 *m/z* při vysokém rozlišení. Poté následovala izolace iontů a HCD (vysokoenergetická kolizní disociace)

fragmentace na kvadrupólu. Produktové ionty byly dále zadržovány na lineární iontové pasti a následně skenovány na Orbitrapu. Byla nastavena monoizotopní selekce [68].

### 3.6 Zpracování dat

Výsledky nanoLC-MS/MS analýzy jsem poté vyhodnotila a interpretovala. Data byla nahrána na lokální server *CompuScience-1.vurv.local* ve VÚRV, v. v. i. Data byla vyhodnocována pomocí LFQ algoritmů v softwaru MaxQuant (verze 1.6.3.4) a poté zpracována pro interpretaci v programu Perseus (verze 1.6.2.3). Výsledky byly prohledávány v MaxQuant oproti neredundantní databázi proteinů stažené 8. 1. 2020 z NCBI pro „*Apis mellifera*“ (taxonomické zařazení 7460, k 8. 1. 2020 celkem 31980 záznamů). Protože byl v experimentu použit roztoč přenášející viry, byla databáze doplněna o databázi proteinů pro „*Varroa destructor*“ (taxonomické zařazení 109461, k 8. 1. 2020 celkem 30261 záznamů) a také pro „*Apis mellifera* and virus“ (k 8. 1. 2020 4235 záznamů). Minimální velikost peptidu byla zvolena jako 7 aminokyselin. Další zvolené parametry byly: enzymová specifita arginin a lysin na C-konci, fixní carbamidomethyl modifikace, variabilní proteinová acetylace a oxidace methioninu na N-konci. Použité parametry shrnuje tabulka 4.

**Tabulka 4** Použité parametry při vyhodnocování výsledků

Parametr	Zvolené nastavení
databáze	NCBI (verze k 8.1. 2020)
taxonomie	<i>Apis mellifera</i> , <i>Varroa destructor</i> , <i>Apis mellifera</i> and virus
použitá proteáza	trypsin
minimální počet aminokyselin pro identifikaci	7
modifikace peptidů	arginin nebo lysin na C-konci carbamidomethyl modifikace variabilní proteinová acetylace na N-konci variabilní oxidace methioninu na N-konci

Data byla poté zpracována v softwaru Perseus. Pro zpracování byly vybrány LFQ intenzity, pozitivní min. ve 3 vzorcích z celkových 24, které byly převedeny na hodnoty log 2. Pro vizualizaci byly chybějící hodnoty nahrazeny nulou. V druhém případě byly chybějící hodnoty odstraněny z normální distribuce (width: 0.3, down shift: 1.8) a následně byla provedena normalizace dat pomocí Z-skóre. Z mediánů pak byla provedena klastrová analýza a byla nastavena Spearmanova korelace. Dále byla provedena PCA analýza s nastavenou Benjamini-Hochberg korekcí (false discovery rate – FDR = 0,05).

## 4 Výsledky a diskuze

Celkem bylo detekováno 2045 různých proteinů napříč skupinami KON, KON\_IMI, VAR a VAR\_IMI (experimentální podmínky jednotlivých skupin včel shrnuty v tabulce 2 a 3 na str. 25). Klastrová analýza (obr. 5, str. 31) po sloupcích obou heatmap znázorňuje podobnost výsledků proteinového zastoupení skupin VAR\_IMI a KON\_IMI, které řadí do jedné větve, v porovnání se zbylými dvěma skupinami. V heatmapě s nenormalizovanými hodnotami dat se více odlišují výsledky skupiny VAR od ostatních skupin oproti heatmapě s normalizovanými daty, kde skupina VAR vykazuje podobnost se skupinou KON.

### 4.1 Vybrané proteinové hity

Všechny intenzity vybraných proteinů jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6 na straně 30. Hodnoty uvedené v tabulkách značí log 2 relativních transformovaných hodnot LFQ intenzit, které byly počítány algoritmem v programu MaxQuant. Z celkového množství získaných proteinů jsem pro interpretaci vybrala 4 markery, které dále diskutuji.

#### 4.1.1 Heat shock proteiny

Ve všech 6 vzorcích skupin VAR byl detekován Protein lethal (2) essential for life, zkráceně Protein Efl 21 (databázové označení XP\_001120006.2). Ve skupině VAR\_IMI tomu bylo rovněž tak u 5 ze 6 vzorků. Ve skupině KON a KON\_IMI byl tento protein zaznamenán pouze u jednoho vzorku v každé skupině.

#### 4.1.2 Virové proteiny

Ve skupinách VAR\_IMI a VAR byl ve všech 6 vzorcích detekován proteinový hit polyproteinu patřící DWV (databázové označení APP91308.1). Až na jeden vzorek každé skupiny (VAR\_IMI6, VAR6) bylo ve skupině VAR\_IMI jeho zastoupení vyšší než u vzorků ze skupiny VAR. Ve skupině KON a KON\_IMI zaznamenán nebyl.

#### 4.1.3 Proteiny roztoče *Varroa*

Jako proteiny patřící roztoči *Varroa* bylo na základě databáze označeno několik proteinových hitů, ty se ale nacházely i ve vzorcích KON či KON\_IMI, které nebyly napadeny roztočem.

#### 4.1.4 Proteiny včelí imunity

Ve všech 6 vzorcích skupin VAR byl identifikován jako jeden proteinový hit hymenoptaecin precursor, partial (databázové označení ACT66904.1), hymenoptaecin preproprotein (databázové označení NP\_001011615.1) a hymenoptaecin precursor (databázové označení AAA67444.1). V žádném jiném vzorku detekován nebyl.

**Tabulka 5** Hodnoty intenzit MS spekter vybraných proteinů uvedené v hodnotách log 2

	VAR1	VAR2	VAR3	VAR4	VAR5	VAR6
Protein Efl 21	23,21	23,73	24,21	25,40	23,63	23,95
DWV	28,67	29,34	28,80	27,50	28,48	30,49
Hymenoptaecin	28,29	24,37	26,22	28,43	27,20	26,34

	VAR_IMI1	VAR_IMI2	VAR_IMI3	VAR_IMI4	VAR_IMI5	VAR_IMI6
Protein Efl 21	23,44	-	23,54	23,27	23,77	24,10
DWV	31,44	29,67	31,28	30,40	31,13	26,93
Hymenoptaecin	-	-	-	-	-	-

	KON1	KON2	KON3	KON4	KON5	KON6
Protein Efl 21	-	-	-	-	25,73	-
DWV	-	-	-	-	-	-
Hymenoptaecin	-	-	-	-	-	-

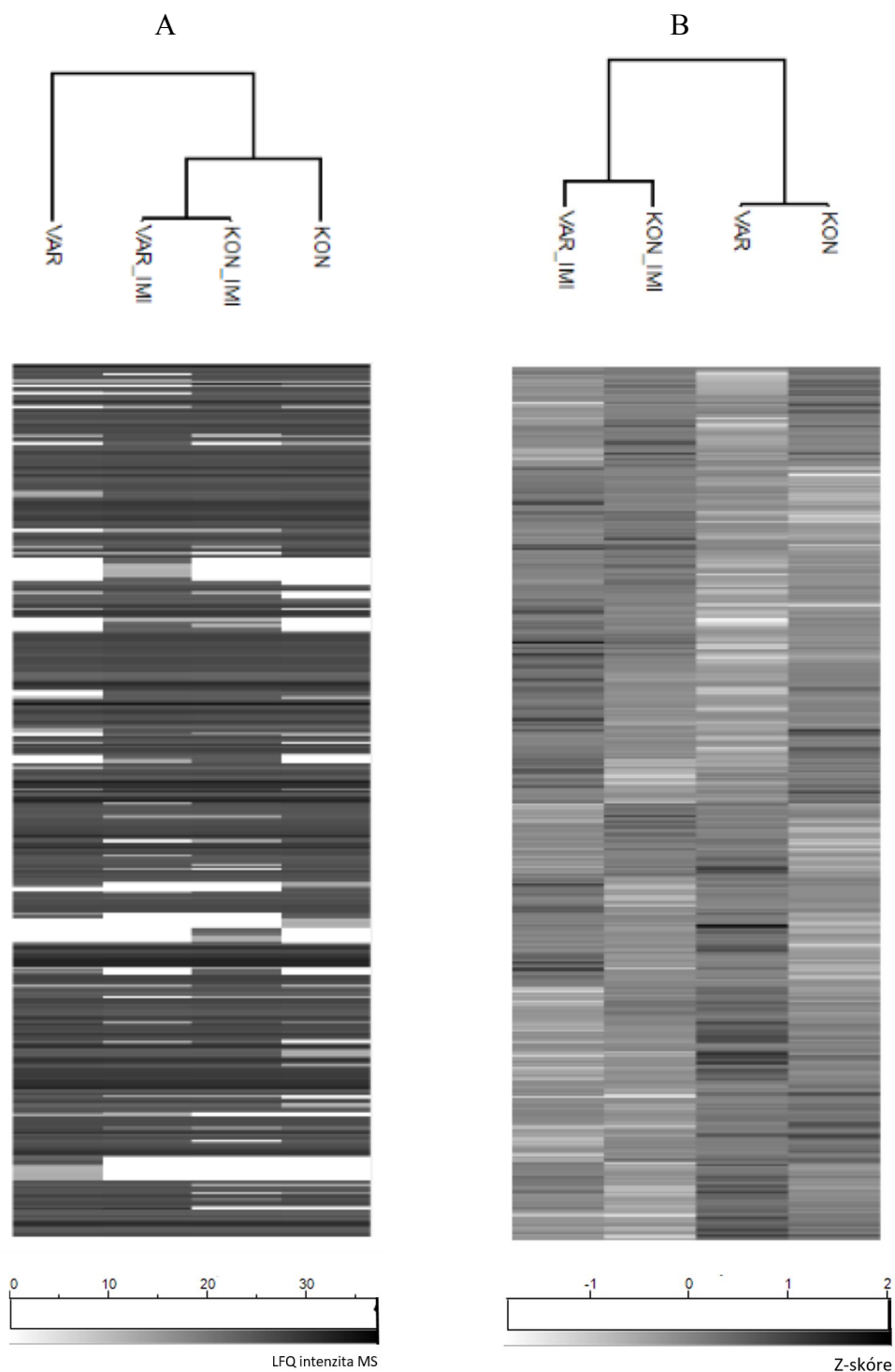
  

	KON_IMI1	KON_IMI2	KON_IMI3	KON_IMI4	KON_IMI5	KON_IMI6
Protein Efl 21	23,36	-	-	-	-	-
DWV	-	-	-	-	-	-
Hymenoptaecin	-	-	-	-	-	-

**Tabulka 6** Mediány hodnot intenzit MS spekter vybraných proteinů uvedené v hodnotách log 2

	VAR	VAR_IMI	KON	KON_IMI
Protein Efl 21	23,84	23,49	-	-
DWV	28,73	30,76	-	-
Hymenoptaecin	26,77	-	-	-

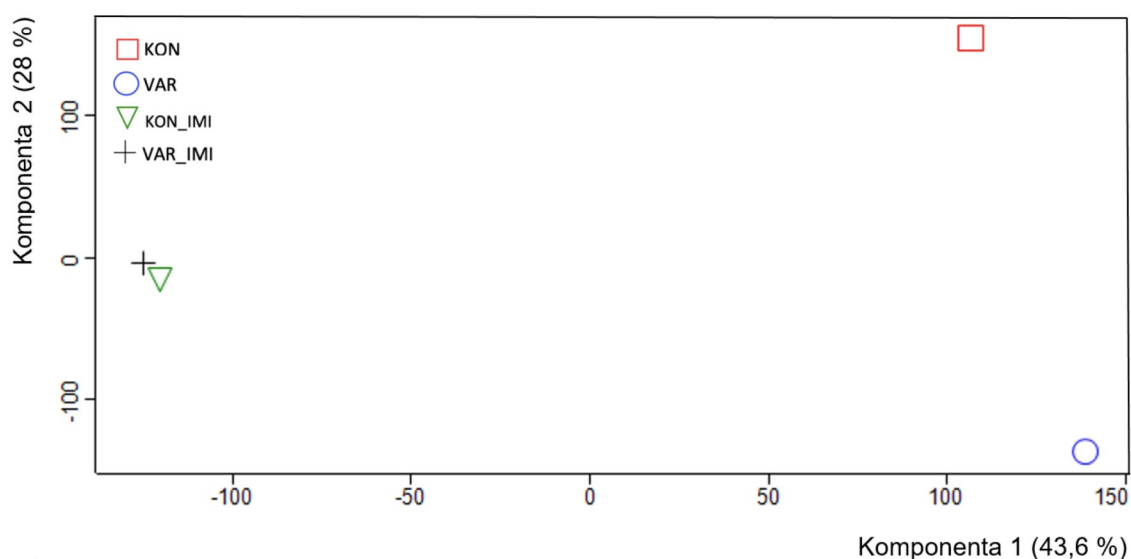
## 4.2 Klastrová analýza proteinů



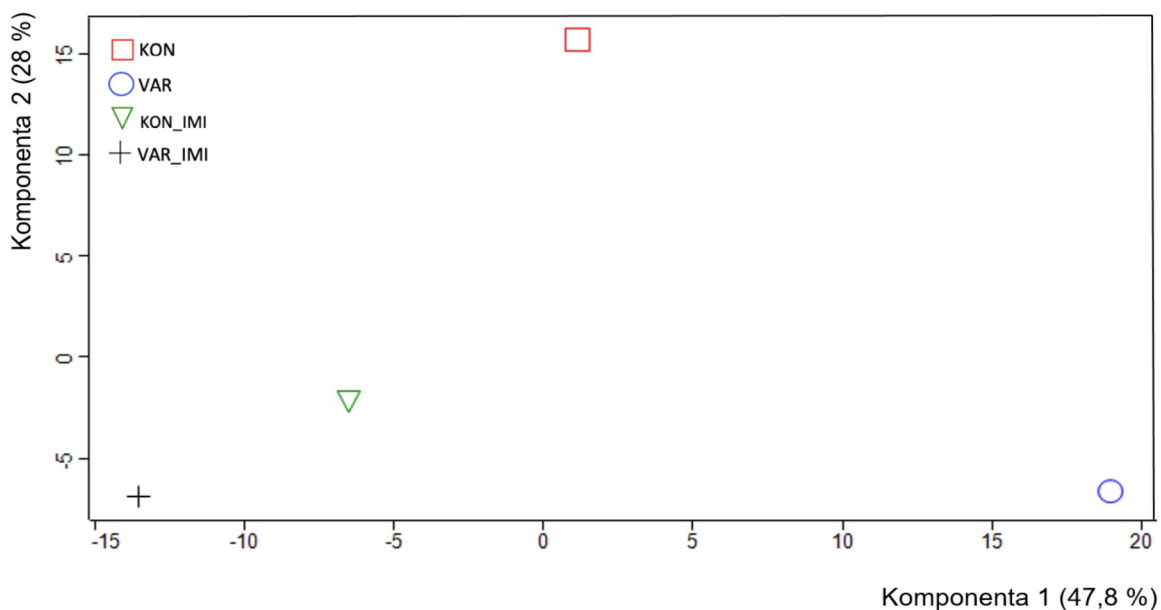
**Obr. 5** Klastrová (shluková) analýza proteinů. Heatmapy byly vytvořeny v programu Perseus z intenzit MS spekter detekovaných proteinů. **A)** Heatmapa obsahuje nenormalizovaná data, kde chybějící data byla nahrazena 0. **B)** Nahrazení chybějících dat a jejich normalizace Z-skórem defaultním nastavením. Pro vyhodnocení každé skupiny se použil medián hodnot dané varianty vzorků.

### 4.3 Analýza hlavních komponent (PCA)

PCA (z anglického principal component analysis) je statistický postup, umožňující převést objemný soubor dat na omezený počet komponent. Pro vyhodnocení zde bylo zahrnuto přes 2000 identifikovaných proteinů lišících se svým zastoupením v každé jedné včele a tyto výsledky byly převedeny na dvoudimenzionální graf, kde komponenta 1 vysvětluje majoritní část celkové původní variability výsledků a komponenta 2 druhou největší část této variability. Pro jednotlivé skupiny byl použit medián hodnot dané varianty vzorků.



**Obr. 6** PCA graf získaný v programu Perseus (nenormalizovaná data)



**Obr. 7** PCA graf získaný v programu Perseus (normalizovaná data)



## 4.4 Diskuze

Vliv imidaklopridu na proteinové zastoupení převažoval nad vlivem roztoče. Z obou PCA grafů (obr. 6 a 7, str. 32) je patrná podobnost výsledků obou skupin včel exponovaných imidaklopridem (s roztočem i bez). V grafu s nenormalizovanými daty (obr. 6, str. 32) jsou podle komponenty 1 výsledky těchto dvou skupin výrazně odlehle od kontrolní skupiny včel i skupiny napadené roztočem. Zároveň jsou si obě skupiny exponované imidaklopridem podle obou hlavních komponent navzájem podobné. V grafu s normalizovanými daty (obr. 7, str. 32) se podle komponenty 1 více odlišují výsledky skupiny včel napadených roztočem od ostatních skupin než v předchozím grafu. Obě skupiny exponovaných včel se v druhém grafu opět odlišují od ostatních skupin a vzájemně se podobají podle stejného trendu jako v předchozím grafu ale v menší míře. Skupina exponovaných a zároveň parazitovaných včel tedy podle komponenty 1 vykazuje vyšší podobnost s včelami exponovanými imidaklopridem než s včelami parazitovanými.

Celkem se MS/MS analýzou podařilo detekovat a pomocí databáze NCBI identifikovat 2045 proteinů. Klastrová analýza proteinů (obr. 5, str. 31) ukázala, že exprese některých genů byla ovlivněna přítomností imidaklopridu a ve spojení s přítomným parazitem působily tyto dva faktory synergickým účinkem. V získaných heatmapách se obě skupiny exponované imidaklopridem shlukují do společné větve na základě podobného proteinového zastoupení, což se shoduje s PCA grafy. Pro podrobnější interpretaci jsem vybrala 4 markery, které charakterizují sledované změny.

Použitá koncentrace imidaklopridu 2,5 µg/l v cukerném roztoku odpovídá reálným podmínkám jeho výskytu v pylu či nektaru. Výsledky naznačují, že imidakloprid o této koncentraci přítomný v potravě včel po dobu 72 hodin způsobil vyšší replikaci viru přenášeného roztočem *Varroa*. To vyplývá z vyšší abundance polyproteinu DWV v organismu včel exponovaných imidaklopridem oproti skupině včel neexponovaných ale napadených stejným roztočem. Detekovaný proteinový hit přiřazený DWV měl v těchto vzorcích rozdílnou intenzitu MS spekter (tab. 6, str. 30). Tento proteinový hit nebyl detekován ve zbylých dvou skupinách neparazitovaných roztočem, což značí, že nešlo například o chybu způsobenou kontaminací chovných včel použitých pro experiment. Obdobný jev byl pozorován ve studii, sledující vliv neonikotinoidů klothianidinu a imidaklopridu. Expozice klothianidinem ale i imidaklopridem také způsobila vyšší virulenci DWV, který zde byl detekován genomickou metodou. Klothianidin snižuje aktivaci tzv. NF-κB (nukleární faktor kappa B) signalizační dráhy, která je nedílnou součástí imunity. Klothianidin zvyšuje u

bezobratlých živočichů expresi genu pro LRR (leucine-rich repeat) proteiny, které potlačují tuto signální dráhu. [97]. Imidakloprid tak zřejmě působí obdobným účinkem jako klothianidin.

Ve všech včelách vystavených parazitaci byl detekován protein hymenoptaecin (tab. 5, str. 30). Hymenoptaecin je jeden ze 6 antimikrobiálních polypeptidů, který se při infekci vyskytuje ve včelí hemolymfě. Jeho produkci indukuje přítomnost patogenu. Jde o polypeptid bohatý na glycin. Vyznačuje se antimikrobiálními účinky vůči Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím [98]. Ovšem přítomnost imidaklopridu u včel napadených tímto roztočem způsobila, že příslušný proteinový hit hymenoptaecinu nebyl ani v jednom takovém vzorku detekován. Imidakloprid tedy zřejmě způsobil blokadu genové exprese pro tento protein, který je důležitý pro včelí imunitu. Výše zmíněná studie zabývající se regulací NF- $\kappa$ B signální dráhy prokázala, že klothianidin snížil expresi genu pro jiný antimikrobiální protein a to apidaecin [97]. Imidakloprid a další neonikotinoidy tak zřejmě narušují imunitní odpověď exponovaných včel snížením exprese genů antimikrobiálních peptidů a potlačením NF- $\kappa$ B signální dráhy.

Roztoč u včel způsobil zvýšenou expresi genu pro protein Protein lethal (2) essential for life (tab. 5, str. 30). Jeho expresi může způsobit nejen roztoč ale i přítomný DWV [99]. Jde o malý heat shock protein, patřící do (HSP20) rodiny [100]. Zvýšená abundance tohoto proteinu v provedeném experiment však nebyla ovlivněna přítomností imidaklopridu. To neodpovídá experimentu s exponovanými čmeláky, kde byla exprese genu tohoto proteinu přítomností imidaklopridu zvýšena [68]. To ale mohlo být ovlivněno jiným druhem experimentu (krátkodobý vs. dlouhodobý) nebo jiným druhem zvoleného organismu (včela vs. čmelák).

Zároveň nebyl nalezen spolehlivý marker identifikace roztoče *Varroa* ve včelích vzorcích. Detekované, a následně na základě databáze NCBI přiřazené proteiny tomuto roztoči, se totiž nacházely i ve vzorcích včel kontrolních, které jím nebyly napadeny. Lze je tedy považovat za falešně pozitivní markery *Varroa*.

## 5 Závěr

Tato práce měla za cíl ukázat, jaký vliv má subletální množství pesticidu imidaklopridu ze skupiny neonikotinoidů na prospívání včely medonosné. Právě neonikotinoidy a především imidakloprid jsou podezřelé, že jsou jedním z významných faktorů syndromu zhroucení včelstev, který lze v posledních více než deseti letech sledovat napříč Evropou i USA. I když už jsou tyto látky v EU zakázané, lze stále detekovat jejich rezidua v životním prostředí. V teoretické části byla shrnuta životní strategie včely medonosné a dále jsem se věnovala CCD a nejvýznamnějším příčinám ztrát včel. Zvláště jsem se zaměřila na pesticidy, a to především neonikotinoidy, jejichž zástupce imidakloprid byl použit pro experiment. V teoretické části je uvedena řada studií zabývajících se interakcí mezi patogeny a pesticidy, jelikož právě tyto interakce se zdají být klíčové pro zdraví včel.

V experimentu bylo nutné co nejvíce simulovat reálné podmínky, kdy včela sbírá pyl či nektar kontaminovaný pesticidy. Byla tedy připravena taková koncentrace imidaklopridu v cukerném roztoku, která odpovídá reálným hodnotám a pro včelu není letální. Zároveň bylo cílem najít optimální postup experimentu, aby výsledky nebyly příliš ovlivněny stresem včel z jejich izolace, nebo nešetrné manipulace. Proto byly včely uchovávány v termostatu při teplotě 35 °C a jejich klícky byly natřeny voskem, aby simulovaly prostředí úlu. Další podmínkou bylo vybrat pro provedení experimentu jen ty včely, které jsou ve stejném stádiu vývoje. Jiné kasty či stáří jedinců by mohly zkreslovat výsledky. Do experimentu byl navíc zahrnut běžně rozšířený roztoč *Varroa* jako další stresový faktor. Roztoč byl vybrán ze včelstva napadeného virem deformovaných křídel a fungoval tedy i jako přenašeč tohoto viru. I pro manipulaci s těmito jedinci bylo potřeba najít optimální řešení.

Experiment probíhal 3 dny a následně byly vzorky zpracovány proteomickou analýzou. Poté byly výsledky analýzy vyhodnoceny pomocí softwaru MaxQuant a Perseus. Proteinové zastoupení včel exponovaných imidaklopridu a *Varroa* bylo odlišné od kontrolních včel. K podrobnější diskuzi jsem vybrala 4 markery. Výsledky proteomické analýzy nanoLC-MS/MS prokázaly, že imidakloprid o koncentraci 2,5 µg/l přítomný v potravě po dobu 3 dnů zvýšil virulenci viru deformovaných křídel přenášeného přítomným roztočem. To vyplývá z rozdílných abundancí polypeptidu DWV ve včelách exponovaných a neexponovaných imidaklopridem. Imidakloprid tak možná působí stejným způsobem jako další neonikotinoid klothianidin, který u včel snižuje aktivaci NF-κB signální dráhy, která se podílí na imunitní odpovědi organismu na přítomnost patogenu. Navíc imidakloprid u včel napadených roztočem způsobil, že neprodukovaly protein hymenoptaecin, který je pro své

antimikrobiální vlastnosti součástí včelí humorální imunity. Jeho produkci za normálních podmínek indukuje přítomnost patogenu, přesně jako tomu bylo u včel napadených roztočem, které nebyly exponovány imidaklopridem. Imidakloprid neovlivnil míru exprese genu pro heat shock protein Protein lethal (2) essential for life, kterou vyvolal přítomný roztoč nebo vir. Nalezené proteiny roztoče *Varroa* ve vzorkách byly falešně negativní markery, protože byly detekované i v kontrolních vzorkách včel.

Pro prokázání hypotéz je potřeba experiment zopakovat a dále analyzovat všechny vzorky pomocí 2D elektroforézy. V rámci této bakalářské práce byla provedena optimalizace čištění a kvantifikace proteinů v homogenátech včelích vzorků v SDC-TEAB, k čemuž byly použity 2-D Clean-Up kit (katalogové číslo: 80-6484-51, GE Healthcare, New Jersey, USA) a 2-D Quank kit (katalogové číslo: 80-6483-56, GE Healthcare, New Jersey, USA). Do realizace této práce jsem ale nestihla provést 2D elektroforézu všech vzorků, což je výzvou do budoucna.

## Použitá literatura

- [1] Southwick, E.; Southwick L.: Estimating the Economic Value of Honey Bees (*Hymenoptera: Apidae*) as Agricultural Pollinators in the United States. *Journal of Economic Entomology* **85**, 621–633 (1992).
- [2] Winston, M. L.: *The Biology of the Honey Bee*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 1991. ISBN 0-674-07409-2.
- [3] Žďárek, J.: *Hmyzí rodiny a státy*. Praha: Academia, 2013. ISBN 978-80-200-2225-7.
- [4] Surlis, C.; Carolan, J. C.; Coffey, M.; Kvanagh, K.: Quantitative Proteomics Reveals Divergent Responses in *Apis mellifera* Worker and Drone Pupae to Parasitization by *Varroa destructor*. *Journal of Insect Physiology* **107**, 291–301 (2018).
- [5] Erban, T.; Harant, K.; Kamler, M.; Markovič, M.; a Titěra, D.: Detailed Proteome Mapping of Newly Emerged Honeybee Worker Hemolymph and Comparison with the Red-Eye Pupal Stage. *Apidologie* **47**, 805–817 (2016).
- [6] Wasinger, V. C.; Cordwell, S. J.; Cerpa-Poljak, A.; Yan, Y. X.; Gooley, A. A.; Wilkins M. R.: Progress with Gene-Product Mapping of the *Mollicutes: Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**, 1090–1094 (1995).
- [7] Falk, S.: *Field Guide to the Bees of Great Britain and Ireland*. London: Bloomsbury Publishing, 2015. ISBN 978-1-910389-03-4.
- [8] vanEngelsdorp, D.; Hayes Jr., J.; Underwood, R.; Pettis, J. S.: A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS One* **3**, Art.No. e4701 (2008).
- [9] Brodschneider, R.; Gray, A.; Adjlane, N.; Ballis A.; Brusbardis, V.; Charrière, J. D.; Chlebo, R.; Coffey, M. F.; Dahle, B.; de Graaf, D. C.; Dražić, M. M.; Evans, G.; Fedoriak, M.; Forsythe, I.; Gregorc, A.; Grzęda, U.; Hetzroni, A.; Kauko, L.; Kristiansen, P.; Martikkala, M.; Hernández, R. M.; Medina-Flores, C. A.; Mutinell, F.; Raudmetrs, A.; Ryzhiko, V. A.; Simon-Delso, N.; Stevanovic, J.; Uzunov, A.; F Vejsnæs, F.; Wöhl, S.; Zammit-Mangion, M.; Danihilík, J.: Multi-Country Loss Rates of Honey Bee Colonies During Winter 2016/2017 from the COLOSS Survey. *Journal of Apicultural Research* **57**, 452–457 (2018).
- [10] Neumann P.; Carreck, N.: Honey Bee Colony Losses. *Journal of Apicultural Research* **49**, 1–6 (2010).
- [11] vanEngelsdorp, D.; Evans, J. D.; Saegerman, C.; Mullin, C.; Haubruge, E.; Nguyen, K. B.; Frazier, M.; Cox-Foster, D.; Chen, Y. P.; Underwood, R.; Tarry, D.; Pettis, J.S.: Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS One* **4**, Art. No. e6481 (2009).

- [12] Anderson, D.; Trueman, J. W. H.: *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) Is More than One Species. *Experimental and Applied Acarology* **24**, 165–189 (2000).
- [13] Rath, W.; Dreschler, W.: Response of *Apis cerana Fabr* towards Brood Infested with *Varroa jacobsoni Oud* and Infestation Rate of Colonies in Thailand. *Apidologie* **21**, 311–321 (1990).
- [14] Gerard, D.; Guerin, P. M.: Behavioral Attributes and Parental Care of *Varroa* Mites Parasitizing Honeybee Brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **34**, 305–319 (1994).
- [15] Dahle, B.: The Role of *Varroa destructor* for Honey Bee Colony Losses in Norway. *Journal of Apicultural Research* **49**, 124–125 (2010).
- [16] Státní veterinární správa: *Varroáza včel* [online]. [cit. 2019-11-16]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/varroaza-vcel/>
- [17] Erban, T.; Harant, K.; Hubálek, M.; Vítámvás, P.; Kamler, M.; Poltronieri, P.; Tyl, J.; Markovič, M.; Titěra, D.: In-Depth Proteomic Analysis of *Varroa destructor*: Detection of DWV-Complex, ABPV, VdMLV and Honeybee Proteins in the Mite. *Scientific Reports* **5**, Art. No. 13907 (2015).
- [18] Bailey, L.; Gibbs, A. J.; Woods, R. D.: Two Viruses from Adult Honey Bees (*Apis mellifera Linnaeus*). *Virology* **21**, 390–395 (1963).
- [19] Bailey, L.; Ball, V. B.: *Honey Bee Pathology*. London: Academic press, 1991. ISBN 978-0-12-073481-8.
- [20] Tantillo, G.; Bottaro, M.; di Pinto, A.; Martella, V.; di Pinto, P.; Terio, V.: Virus Infections of Honeybees *Apis mellifera*. *Italian Journal of Food Safety* **4**, Art. No. 5634 (2015).
- [21] McMenamin, A. J.; Genersch, E.: Honey Bee Colony Losses and Associated Viruses. *Current Opinion in Insect Science* **8**, 121–129 (2015).
- [22] Runckel, Ch.; Flenniken, M. L.; Engel, J. C.; Ruby, J. G.; Ganem, D.; Andino, R.; Derisi, J. L.: Temporal Analysis of the Honey Bee Microbiome Reveals Four Novel Viruses and Seasonal Prevalence of Known Viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One* **6**, Art. No. e20656 (2011).
- [23] Genersch, E.: American Foulbrood in Honeybees and Its Causative Agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S10–S19 (2010).
- [24] Forsgren, E.: European Foulbrood in Honey Bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S5–S9 (2010).

- [25] World Organisation for Animal Health: *Diseases of Bees* [online].  
[cit. 2019-11-17]. Dostupné z: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Diseases-of-bees>
- [26] Chen, Y. P.; Huang, Z. Y.: *Nosema ceranae* a Newly Identified Pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie* **41**, 364–374 (2010).
- [27] Malone, L. A.; Gatehouse, H. S.: Effects of *Nosema apis* Infection on Honey Bee (*Apis mellifera*) Digestive Proteolytic Enzyme Activity. *Journal of Invertebrate Pathology* **71**, 169–174 (1998).
- [28] Kralj, J.; a Fuchs, S.: *Nosema sp.* Influences Flight Behavior of Infected Honey Bee *Apis mellifera* Foragers. *Apidologie* **41**, 21–28 (2010).
- [29] Krieger, R. (ed.): *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Third edition. San Diego, California: Academic press, 2010. ISBN 978-0-08-092201-0.
- [30] European Commission: *EU Pesticides Database* [online]. [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=active\\_substance.selection&language=EN](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=active_substance.selection&language=EN)
- [31] Knowles, A. D (ed.): *Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations*. London: Kluwer Academic, 1998. ISBN 978-94-011-4956-3.
- [32] Herrero-Latorre, C.; Barciela-García, J.; García-Martín, S.; Peña Crecente, R. M.: The Use of Honeybees and Honey as Environmental Bioindicators for Metals and Radionuclides: a Review. *Environmental Reviews* **25**, 463–480 (2017).
- [33] Beekman, M.; Ratnieks, F. L. W.: Long-Range Foraging by the Honey-Bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology* **14**, 490–496 (2001).
- [34] Mullin, Ch. A.; Frazier, M.; Frazier, J. L.; Ashcraft, S.; Simonds, R.; vanEngelsdorp, D.; Pettis, J. S.: High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS One* **5**, Art. No. e9754 (2010).
- [35] ČR. Zákon č. 369/2019 Sb. ze dne 7. prosinec 2019, kterým se mění zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a další související zákony. In: Sbírka zákonů ČR. 2019, částka 153.
- [36] Ministerstvo zemědělství: *Národní akční plán pro bezpečné používání pesticidů pro období 2018-2022*. [online]. 6. červen 2018 [cit. 2020-02-10]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/zivotni-prostredi/udrzitelne-pouzivani-pesticidu/>

- [37] Heindel, J. J.; Jobling, S.; Kidd, K. A.; Zoeller, R. T.: *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012. Summary for Decision-Makers* [online].  
[cit. 2020-04-23] Dostupné z:  
[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/78102/WHO\\_HSE\\_PHE\\_IHE\\_2013.1\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/78102/WHO_HSE_PHE_IHE_2013.1_eng.pdf?sequence=1)
- [38] Zoeller, R. T.; Brown, T. R.; Doan, L. L.; Gore, A. C.; Skakkebaek, N. E.; Soto, A. N.; Woodruff, T. J.; vom Saal, F. S.; Endocrine-Disrupting chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from the Endocrine Society. *Endocrinology* **153**, 4097–4110 (2012).
- [39] Darbre, P. D.; The History of Endocrine-Disrupting Chemicals. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* **7**, 26–33 (2019).
- [40] Rhouma, K. B.; Tebourbi, O.; Krichah, R.; Sakly, M.; Reproductive Toxicity of DDT in Adult Male Rats. *Human & Experimental Toxicology* **20**, 393–397 (2001).
- [41] International Agency for Research on Cancer: *IARC Monograph on Glyphosate* [online]. 2015 [cit. 2020-04-21]. Dostupné z:  
<https://www.iarc.fr/featured-news/media-centre-iarc-news-glyphosate/>
- [42] Konieczna, A.; Rutkowska, A.; Rachón, D.: Health Risk of Exposure to Bisphenol A (BPA). *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* **66**, 5–11 (2015).
- [43] Feng, Y.; Zhang, P.; Zhang, Z.; Shi, J.; Jiao, Z.; Shao, B.: Endocrine Disrupting Effects of Triclosan on the Placenta in Pregnant Rats. *PLoS One* **11**, Art. No. e0154758 (2016).
- [44] Weatherly, L.M.; Gosse, J. A.: Triclosan Exposure, Transformation, and Human Health Effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **20**, 447–469 (2017).
- [45] Delfosse, V.; Dendele, B.; Huet, T.; Grimaldi, M.; Boulahtouf, A.; Gerbal-Chaloin, S.; Beucher, B.; Roecklin, D.; Müller, Ch.; Rahmani, R.; Cavaillès, V.; Daujat-Chavanieu, M.; Vivat, V.; Pascussi, J. M.; Balaguer, P.; Bourguet, W.: Synergistic Activation of Human Pregnane X Receptor by Binary Cocktails of Pharmaceutical and Environmental Compounds. *Nature Communication* **6**, Art. No. 8089 (2015).
- [46] Klierwer, S. A.; Goodwin, B.; Willson, T, M.: The Nuclear Pregnane X Receptor: a Key Regulator of Xenobiotic Metabolism. *Endocrine Reviews* **23**, 687–702 (2002).
- [47] Mullin, Ch. A.; Chen, J.; Fine, J. D.; Frazier, M.; Frazier, J. L.: The Formulation Makes the Honey Bee Poison. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **120**, 27–35 (2015).



- [48] Van der Sluijs, J.; Simon-Delso, N.; Goulson, D.; Maxim, L.; Bonmatin, J. M.; Belzunces, L. P.: Neonicotinoids, Bee Disorders and the Sustainability of Pollinator Services. *Current Opinion in Environmental Sustainability* **5**, 293–305 (2013).
- [49] Gupta, R. C.; Mukherjee, I. R. M.; Malik, J. K.; Doss, R. B.; Dettbarn, W. D.; Milatovic, D.: Insecticides. In: *Biomarkers of Toxicology* [online]. R. C. Gupta (ed.). Amsterdam: Academic Press, 2019, 455–475. [cit. 2020-02-15]. ISBN 978-0-12-814655-2. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=tAuIDwAAQBAJ&pg=PA457&lpg=PA457&dq=insecticides+gupta&source=bl&ots=7yMo5DwLJL&sig=ACfU3U16miOo-uMGXIbGWlfP7YcW1gNHUQ&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwjE4-LWo\\_fpAhXpIMUKHUxiDOAQ6AEwCnoECAsQAQ#v=onepage&q=insecticides%20gupta&f=false](https://books.google.cz/books?id=tAuIDwAAQBAJ&pg=PA457&lpg=PA457&dq=insecticides+gupta&source=bl&ots=7yMo5DwLJL&sig=ACfU3U16miOo-uMGXIbGWlfP7YcW1gNHUQ&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwjE4-LWo_fpAhXpIMUKHUxiDOAQ6AEwCnoECAsQAQ#v=onepage&q=insecticides%20gupta&f=false)
- [50] Liu, M. Y.; Casida, J. E.: High Affinity Binding of [3H]Imidacloprid in the Insect Acetylcholine Receptor. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **46**, 40–46 (1993).
- [51] Zwart, R.; Oortgiesen, M.; Vijverberg, H. P. M.: Nitromethylene Heterocycles: Selective Agonists of Nicotinic Receptors in Locust Neurons Compared to Mouse N1E-115 and BC3H1 Cells. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **48**, 202–213 (1994).
- [52] Brandt, A.; Gorenflo, A.; Siede, R.; Meixner, M.; a Büchler, R.: The Neonicotinoids Thiacloprid, Imidacloprid, and Clothianidin Affect the Immunocompetence of Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* **86**, 40–47 (2016).
- [53] Royal Society of Chemistry: *Imidacloprid* [online]. [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.77934.html>
- [54] European Commission: *Neonicotinoids* [online]. [cit. 2019-02-17]. Dostupné z: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval\\_active\\_substances/approval\\_renewal/neonicotinoids\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/approval_renewal/neonicotinoids_en)
- [55] Evropská komise. *Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 485/2013 ze dne 24. května 2013, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinných látek klothianidin, thiamethoxam a imidakloprid, a kterým se zakazuje použití a prodej osiva ošetřeného přípravky na ochranu rostlin obsahujícími uvedené účinné látky* [online]. Úřední věstník EU 2013; L139, 25. 5. 2013: 12-14. [cit. 2020-02-17]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:139:0012:0026:CS:PDF>

- [56] Evropská komise. *Prováděcí nařízení komise (EU) 2018/783 ze dne 29. května 2018, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinné látky imidaklopid* [online]. Úřední věstník EU 2018; L132, 30. 5. 2018: 31-34. [cit. 2020-02-17]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0783&from=EN>
- [57] Evropská komise. *Prováděcí nařízení Komise (EU) 2018/784 ze dne 29. května 2018, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinné látky klothianidin* [online]. Úřední věstník EU 2018; L132, 30. 5. 2018: 35-39. [cit. 2020-02-17]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0784&from=EN>
- [58] Evropská komise. *Prováděcí nařízení komise (EU) 2018/785 ze dne 29. května 2018, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinné látky thiamethoxam* [online]. Úřední věstník EU 2018; L132, 30. 5. 2018: 40-44. [cit. 2020-02-17]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0785&from=CS>
- [59] Evropská komise. *Prováděcí nařízení komise (EU) 2018/113 ze dne 24. ledna 2018, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh obnovuje schválení účinné látky acetamiprid a kterým se mění příloha prováděcího nařízení Komise (EU) č. 540/2011* [online]. Úřední věstník EU 2018; L20, 25. 1. 2018: 7-8. [cit. 2020-02-17]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0113&from=BG>
- [60] Liu, Y. J.; Qiao, N. H.; Diao, Q. Y.; Jing, Z.; Vukanti, R.; Dai, P. L.; Ge, Y.: Thiaclopid Exposure Perturbs the Gut Microbiota and Reduces the Survival Status in Honeybees. *Journal of Hazardous Materials* **389**, Art. No. 121818 (2020).
- [61] Shi, T.; Burton, S.; Wang, Y.; Shengyun, X.; Zhang, W.; Linsheng, Y.: Metabolomic Analysis of Honey Bee, *Apis mellifera* L. Response to Thiaclopid. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **152**, 17–23 (2018).
- [62] Suchail, S.; Guez, D.; Belzunces L.: Discrepancy between Acute and Chronic Toxicity Induced by Imidaclopid and Its Metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 2482–2486 (2001).
- [63] Suchail, S.; Guez, D.; Belzunces L.: Characteristics of Imidaclopid Toxicity in Two *Apis mellifera* Species. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 1901–1905 (2000).

- [64] Bonmatin, J. M.; Smith, I. C. P.; Charvet, R.; Le Fleche, Ch.; Colin, M. E.; Benhsch, E. R.: A LC/APCI-MS/MS Method for Analysis of Imidacloprid in Soils, in Plants, and in Pollens. *Analytical Chemistry* **75**, 2027–2033 (2003).
- [65] Bonmatin, J. M.; Marchand, P. A.; Cotte, J. F.; Aajoud, A.; Casabianca, H.; Goutailler, G.; Courtiade, M.; Del Re, A.; Capri, E.; Fragoulis, E. G.; Trevisan, M.: Bees and Systemic Insecticides (Imidacloprid, Fipronil) in Pollen: Subnano-Quantification by HPLC/MS/MS and GC/MS In: *Environmental fate and ecological effects of pesticides [XIII Symposium Pesticide Chemistry]* [online]. Del Re, A.; Capri, E. Pavia: La Goliardica Pavese, 2007, 837–845. ISBN 9788878304734. [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/47463365\\_Bees\\_and\\_systemic\\_insecticides\\_imidacloprid\\_fipronil\\_in\\_pollen\\_subnano-quantification\\_by\\_HPLCMSMS\\_and\\_GCMS](https://www.researchgate.net/publication/47463365_Bees_and_systemic_insecticides_imidacloprid_fipronil_in_pollen_subnano-quantification_by_HPLCMSMS_and_GCMS)
- [66] Rortais, A.; Arnold, G.; Halm, M. P.; Touffet-Briens, F.: Modes of Honeybees Exposure to Systemic Insecticides: Estimated Amounts of Contaminated Pollen and Nectar Consumed by Different Categories of Bees. *Apidologie* **36**, 71–83 (2005).
- [67] Zhiguo, L.; Tiantian, Y.; Chen, Y.; Heerman, M.; He, J.; Nie, H.; Su, S.; Brain Transcriptome of Honey Bees (*Apis mellifera*) Exhibiting Impaired Olfactory Learning Induced by a Sublethal Dose of Imidacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **156**, 36–43 (2019).
- [68] Erban, T.; Sopko, B.; Talacko, P.; Halesová, T.; Pekas, A.: Chronic Exposure of Bumblebees to Neonicotinoid Imidacloprid Suppresses the Entire Mevalonate Pathway and Fatty Acid Synthesis. *Journal of Proteomics* **196**, 69–80 (2019).
- [69] Rondeau, G.; Sánchez-Bayo, F.; Tennekes, H. A.; Decourtye, a.; Ramírez-Romero, R.; Desneux, N.: Delayed and Time-cumulative Toxicity of Imidacloprid in Bees, Ants and Termites. *Scientific Reports* **4**, Art. No. 5566 (2015).
- [70] Rawson, R. B.: The SREBP Pathway — Insights from Insigs and Insects. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 631–640 (2003).
- [71] Sakakura, Y.; Shimano, H.; Sone, H.; Takahashi, A.; Inoue, K.; Toyoshima, H.; Suzuki, S.; Yamada, N.: Sterol Regulatory Element-Binding Proteins Induce an Entire Pathway of Cholesterol Synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **286**, 176–183 (2001).
- [72] Royal Society of Chemistry: *NI3077000* [online]. [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10248199.html>

- [73] Pettis, J. S.; vanEngelsdorp, D.; Johnson, J.; Dively, G.: Pesticide Exposure in Honey Bees Results in Increased Levels of the Gut Pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* **99**, 153–158 (2012).
- [74] Alaux, C.; Brunet, J. L.; Dussaubat, C.; Mondet, F.; Tchamitchan, S.; Cousin, M.; Brillard, J.; Baldy, A.; Belzunces, L. P.; Le Conte, Y.: Interactions Between *Nosema* Microspores and a Neonicotinoid Weaken Honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* **12**, 774–782 (2010).
- [75] Grassl, J.; Holt, S.; Cremen, N.; Peso, M.; Hahne, D. R.; Baer, B.: Synergistic Effects of Pathogen and Pesticide Exposure on Honey Bee (*Apis mellifera*) Survival and Immunity. *Journal of Invertebrate Pathology* **159**, 78–86 (2018).
- [76] Coulon, M.; Schurr, F.; Martel, A. C.; Cougoule, N.; Bégau, A.; Mangoni, P.; Dalmon, A.; Alaux, C.; Le Conte, Y.; Thiery, R.; Ribière-Chabert, M.; Dubois, E.: Metabolisation of Thiamethoxam (a Neonicotinoid Pesticide) and Interaction with the Chronic Bee Paralysis Virus in Honeybees. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **144**, 10–18 (2018).
- [77] Alikhan, K.; Al-Ghamdi, A. A.; Ghramh, H.A.; Ansari, M. J.; Ali, H.; Alamri, S. A.; Al-Kahtani, S. N.; Adgaba, N.; Qasim, M.; Hafeez, M.: Structural Diversity and Functional Variability of Gut Microbial Communities Associated with Honey Bees. *Microbial Pathogenesis* **138**, Art. No. 103793 (2020).
- [78] Keeling, P. J.; Fast, N. M.: Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology* **56**, 93–116 (2002).
- [79] Söderhäll, K.; Cerenius, L.: Role of the Prophenoloxidase-Activating System in Invertebrate Immunity. *Current opinion in Immunology* **10**, 23–28 (1998).
- [80] Lavine, M.D.; Strand, M. R.: Insect Hemocytes and Their Role in Immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 1259–1309 (2002).
- [81] Coulon, M.; Schurr, F.; Martel, A.C.; Cougoule, N.; Bégau, A.; Mangoni, P.; Di Prisco, G.; Dalmon, A.; Alaux, C.; Ribière-Chabert, M.; Le Conte, Y.; Thiery, R.; Dubois, E.: Influence of Chronic Exposure to Thiamethoxam and Chronic Bee Paralysis Virus on Winter Honey Bees. *PLoS One* **14**, Art. No. e0220703 (2019).
- [82] Wright, P. C.; Noirel, J.; Ow, S. Y.; Fazeli, A.: A Review of Current Proteomics Technologies with a Survey on Their Widespread Use in Reproductive Biology Investigations. *Theriogenology* **77**, 738–765 (2012).

- [83] Hora, Z. A.; Altaye, S. Z.; Wubie, A. J.; Li, J.: Proteomics Improves the New Understanding of Honeybee Biology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**, 3605–3615 (2018).
- [84] Erban, T.; Shcherbachenko, E.; Talacko, P.; a Harant, K.: The Unique Protein Composition of Honey Revealed by Comprehensive Proteomic Analysis: Allergens, Venom-like Proteins, Antibacterial Properties, Royal Jelly Proteins, Serine Proteases, and Their Inhibitors. *Journal of Natural Products* **82**, 1217–1226 (2019).
- [85] The Honeybee Genome Sequencing Consortium: Insights into Social Insects from the Genome of the Honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**, 931–949 (2006).
- [86] Magdeldin, S.; Enany, S.; Yoshida, Y.; Xo, B.; Zhang, Y.; Zureena, Z.; Lokamani, I.; Yaoita, E.; Yamamoto, T.: Basics and Recent Advances of Two Dimensional-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Clinical Proteomics* **11**, Art. No. 16, (2014).
- [87] López-Ferrer, D.; Canas, B.; Vázquez, J.; Lodeiro, C.; Rial-Otero, R.; Moura, I.; Martínez, J. L. C.: Sample Treatment for Protein Identification by Mass Spectrometry-Based Techniques. *Trends in Analytical Chemistry* **25**, 996–1005 (2006).
- [88] Vajrychová, M.; Tambor, V.; Lenčo, J.: Možnosti proteomických metod v klinické diagnostice. *Klinická biochemie a metabolismus* **20**, 158–164 (2012).
- [89] Darville, L. N. F.; Sokolowski, B. H. A.: Bottom-up and Shotgun Proteomics to Identify a Comprehensive Cochlear Proteome. *Journal of Visualized Experiments*. Art. No. e51186, (2014).
- [90] Olsen, J. V.; Ong, S. E.; Mann, M.: Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular & Cellular Proteomics* **3**, 608–614 (2004).
- [91] Simpson, R. J.: Fragmentation of Protein Using Trypsin. *Cold Spring Harbor Protocols* (2006).
- [92] Goodlett, D. R.; Yi, E. C.: Proteomics without Polyacrylamide: Qualitative and Quantitative Uses of Tandem Mass Spectrometry in Proteome Analysis. *Functional & Integrative Genomics* **2**, 138–153 (2002).
- [93] Ho, Ch. S.; Lam, Ch., W. K.; Chan, M. H. M.; Law, L. K.; Lit, L. C. W.; NG, K. F.; Suen, M.W. M.; Tai, H. L.: Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clinical Biochemist Reviews* **24**, 3–12 (2003).
- [94] Zhu, H.; Bilgin, M; Snyder, M.: Proteomics. *Annual Review of Biochemistry* **72**, 783–812 (2003).

- [95] Zhang, Y.; Fonslow, B. R.; Shan, B.; Baek, M. Ch.; a Yates, J. R.: III. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews* **113**, 2343–2394 (2013).
- [96] Cottrell, J. S.: Protein Identification Using MS/MS Data. *Journal of Proteomics* **74**, 1824–1851 (2011).
- [97] Di Prisco, G.; Cavaliere, V.; Annoscia, D.; Varricchio, P.; Caprio, E.; Nazzi, F.; Gargiulo, G.; Pennacchio, F.: Neonicotinoid Clothianidin Adversely Affects Insect Immunity and Promotes Replication of a Viral Pathogen in Honey Bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 18466–18471 (2013).
- [98] Casteels, P.; Ampe, Ch.; Jacobs, F. J.; Tempst, P.: Functional and Chemical Characterization of Hymenoptaecin, an Antibacterial Polypeptide That Is Infection-Inducible in the Honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry* **268**, 7044–7054 (1993)
- [99] Erban, T.; Sopko, B.; Kadlíková, K.; Talacko, P.; Harant, K.: *Varroa destructor* Parasitism Has a Greater Effect on Proteome Changes than the Deformed Wing Virus and Activates TGF- $\beta$  Signaling Pathways. *Scientific Reports* **9**, Art. No. 9400 (2019).
- [100] National Center for Biotechnology Information: Protein Lethal(2)essential for Life [*Apis mellifera*] [online]. [cit. 2020-04-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/328779673/>